



Immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs : Analyse par injection en flux continu (FIA) : Applications au dosage des composés polluants

Satish Kumaran

► To cite this version:

Satish Kumaran. Immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs : Analyse par injection en flux continu (FIA) : Applications au dosage des composés polluants. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne; Université Claude Bernard - Lyon I, 1991. Français. NNT : 1991LYO10116 . tel-00836242

HAL Id: tel-00836242

<https://theses.hal.science/tel-00836242>

Submitted on 20 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

N° d'Ordre : 220.91

Année : 1991

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

par

Satish KUMARAN

**IMMOBILISATION D'ENZYMES POUR LA REALISATION DE
BIOCAPTEURS.**

**ANALYSE PAR INJECTION EN FLUX CONTINU (FIA).
APPLICATIONS AU DOSAGE DE COMPOSES POLLUANTS.**

Soutenue le 2 décembre 1991

JURY

Monsieur M. PORTHAULT Président

Messieurs C. BURSTEIN
P. CHAMBON
A. CROCQ
J. D. R. THOMAS
C. TRAN-MINH

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

N° d'Ordre : 220.91

Année : 1991

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

par

Satish KUMARAN

**IMMOBILISATION D'ENZYMES POUR LA REALISATION DE
BIOCAPTEURS.**

ANALYSE PAR INJECTION EN FLUX CONTINU (FIA).

APPLICATIONS AU DOSAGE DE COMPOSES POLLUANTS.

Soutenue le 2 décembre 1991

JURY

Monsieur M. PORTHAULT Président

Messieurs C. BURSTEIN
P. CHAMBON
A. CROCQ
J. D. R. THOMAS
C. TRAN-MINH

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université
1er Vice-Président Fédération Santé
1er Vice-Président Fédération Sciences
Président du Comité de Coordination
des Etudes Médicales
Secrétaire Général

M. le Professeur G. FONTAINE
M. le Professeur P. ZECH
M. le Professeur Y. LEMOIGNE

M. le Professeur P. ZECH
M. F. MARIANI

FEDERATION SANTE

- UFR de Médecine GRANGE-BLANCHE
- UFR de Médecine ALEXIS-CARREL
- UFR de Médecine LYON-NORD
- UFR de Médecine LYON-SUD
- Institut des Sciences Biologiques
et Pharmaceutiques
- UFR d'ODONTOLOGIE
- INSTITUT DES TECHNIQUES DE
READAPTATION
- Département de BIOLOGIE HUMAINE
- Département d'INNOVATION ET DE
COORDINATION PEDAGOGIQUE

Directeur : Mme le Pr. PELLET
Directeur : M. le Pr. EVREUX
Directeur : M. le Pr. PATRICOT
Directeur : M. le Pr. DEJOUR
Directeur : M. le Pr. VILLARD

Directeur : M. le Pr. MAGLOIRE
Directeur : M. le Pr. EYSSETTE

Directeur : M. le Pr. BRYON
Directeur : M. le Pr. LLORCA

FEDERATION SCIENCES

- Institut DES SCIENCES DE LA MATIERE
- Institut DES SCIENCES DE L'INGE-
NIEURIE ET DU DEVELOPPEMENT
TECHNOLOGIQUES
- Institut DE CHIMIE ET BIOLOGIE
- Institut d'ANALYSE DES SYSTEMES
BIOLOGIQUES ET SOCIO-ECONOMIQUES
- Institut DES SCIENCES DE LA TERRE
DE L'OCEAN, DE L'ATMOSPHERE, DE
L'ESPACE ET DE L'ENVIRONNEMENT
- UFR des ACTIVITES PHYSIQUES ET
SPORTIVES
- I.U.T. A
- I.U.T. B
- Département de 1er Cycle
pluridisciplinaire Sciences
- Département de 2ème Cycle
 - Sciences de la Vie et de la
Terre
 - Sciences pour l'Ingénieur
 - Sciences de l'Analyse et de
la Matière

Directeur : M. le Pr. ELBAZ
Directeur : M. le Pr. DIMNET

Directeur : Mme VARAGNAT, M.C.
Directeur : M. le Pr. LEGAY

Directeur : M. le Pr. ELMi

Directeur : M. le Pr. CAMY

Directeur : M. le Pr. GIELLY
Directeur : M. le Pr. PIVOT
Directeur : M. PONCET, M.C.

Directeur : M. le Pr. BLANCHET
Directeur : M. le Pr. BETHOUX

Directeur : M. le Pr. VIALLE

Le prix d'Alliance Universitaire Scientifique et Economique de la Loire - Prix du pôle de l'Eau 1991 - a été décerné pour les travaux présentés dans cette thèse.

Remerciements

Le travail, présenté dans ce mémoire, a été réalisé au Laboratoire de Biotechnologie de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne, sous la direction de Monsieur C. TRAN-MINH, que je voudrais, avant tout, remercier pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans son équipe. Je voudrais aussi remercier Monsieur F. LANCELOT, responsable du Département de Génie Industriel et Biotechnologie, de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne, pour m'avoir donné les moyens d'effectuer ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi :

- à Monsieur le professeur PORTHAULT, de l'Université Claude Bernard, Lyon I, pour avoir accepté de juger ce travail et d'assumer les responsabilités de rapporteur et de Président du jury.
- à Monsieur le professeur BURSTEIN, de l'Université de Paris VII, pour être à la fois rapporteur et membre du jury.

De même, je remercie :

- Monsieur le professeur THOMAS, de School of Chemistry and Applied Chemistry, University of Wales College of Cardiff (UWCC), Royaume-Uni,
 - Monsieur le professeur CHAMBON, responsable scientifique à l'Institut Pasteur et professeur de toxicologie à la Faculté de Pharmacie, de Lyon,
 - Monsieur CROCQ, Ingénieur de la Compagnie Générale des Eaux, Anjou Recherche, Paris,
- pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je suis très reconnaissant envers :

- Drs. J. BOURGOIS et R. GUYONNET, pour les critiques constructives apportées à ce travail.
- Dr. P. FORMISYN, qui a toujours été un ami en cas de besoin et une source d'inspiration depuis mon arrivée au laboratoire. Je le remercie tout spécialement pour le temps et l'effort qu'il a consacrés à la traduction de ma thèse.
- Dr. F. LANTREIBECQ, pour ses suggestions utiles, ses conseils, ses critiques et son humour.
- Christelle, pour avoir été une excellente amie et pour ses précieux conseils et son aide dans la correction de ce rapport aussi souvent que j'en ai eu besoin. Je profite de cette occasion pour lui souhaiter bonne chance dans ce qu'elle entreprendra.
- George, pour tout le temps qu'il a sacrifié pour compléter la simulation mathématique et pour la mettre sous la forme présentée en annexe de ce mémoire.
- Gilles, pour ses tuyaux utiles pour la présentation finale de ce travail.

- Helmut, pour son agréable compagnie et pour le grand plaisir que j'ai eu à travailler avec lui.
- mes collègues Bernadette, Florence, Françoise, Isabelle, Rémy et Stéphane qui ont, d'une manière ou d'une autre, contribué à ce travail.
- Hervé, Marie-Claude et Danielle, qui ont toujours été disponibles pour me donner un coup de main.
- Anne-Marie, non seulement pour son aide dans la conduite de plusieurs expériences, mais aussi pour avoir été une source immense d'encouragements.
- les étudiants en stage du Département de Chimie, de l'Université de Wales, Cardiff : Greg, Colin et Jane, dont j'ai supervisé le travail.

Enfin, je voudrais remercier le Ministère Français de l'Education Nationale pour m'avoir accordé une bourse d'étude pour la préparation de mon Doctorat.

ABBREVIATIONS UTILISEES

ACh	Acétylcholine
AChCl	Chlorure d'acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
APTS	3-aminopropyltriéthoxysilane
ASChI	Iodure d'acétylthiocholine
ASH	Albumine du sérum humain
BuCh	Butyrylcholine
BuChCl	Chlorure de butyrylcholine
BuChE	Butyrylcholinestérase
BuSChI	Iodure de butyrylthiocholine
COD	Choline oxydase
DTNB	Dithio-dinitro benzène
ECS	Electrode calomel saturé
FIA	Analyse par injection en flux continu
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine éthane sulfonique
M.M.	Masse moléculaire
NMP	N-méthyl phénazine
PAAH	Hydrazide de polyacrylamide
2-PAM	Iodure de méthyl -1 aldoxime -2 pyridine
Phosph.	Phosphate
p.p.b.	partie par billion ($1/10^9$)
PSA	Persulfate d'ammonium
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TCNQ	Tétracyanoquinodiméthane
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
THF	Tétrahydrofuranne
TNBS	Acide trinitro -2,4,6, benzène sulfonique
Tris	Tampon Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
TTF	Tétrathiafulvalène
UI	Unités Internationales
U.V.	Ultra-violet

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS UTILISEES

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

1 - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 LES BIOCAPTEURS.....	3
1.1.1 DEFINITION	3
1.1.2 PRINCIPE D'UN BIOCAPTEUR.....	3
1.1.3 APPLICATIONS POTENTIELLES DES BIOCAPTEURS.....	4
1.2 LES ENZYMES COMME BIOCATALYSEURS.....	4
1.2.1 CINETIQUES ENZYMATIQUES.....	5
1.2.2 IMMOBILISATION DES ENZYMES.....	7
1.2.3 EFFETS DE L'IMMOBILISATION DES ENZYMES	7
1.2.3.1 Sur la stabilité.....	7
1.2.3.2 Sur la cinétique	7
1.3 LES ELECTRODES ENZYMATIQUES.....	8
1.3.1 BIOCAPTEURS POTENTIOMETRIQUES.....	8
1.3.2 BIOCAPTEURS AMPEROMETRIQUES	8
1.4 ELECTRODES ENZYMATIQUES POUR LA DETERMINATION D'INHIBITEURS.....	9
1.4.1 LES CHOLINESTERASES.....	9
1.4.2 LES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORES ET LES CARBAMATES.....	10
1.4.3 MECANISME D'INHIBITION.....	11
1.4.3.1 Inhibition par un organophosphate.....	
1.4.3.2 Inhibition par un carbamate	
1.4.4 DETERMINATION DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORES ET DES CARBAMATES	13
1.4.5 REACTIVATION DES CHOLINESTERASES INHIBEES.....	13
1.5 OBJECTIFS DE CETTE ÉTUDE.....	14

2 - MATERIELS ET METHODES

2.1	PRODUITS CHIMIQUES.....	15
2.1.1	ENZYMES.....	15
2.1.2	SUBSTRATS	15
2.1.3	INHIBITEURS	16
2.1.4	REACTIVATEUR.....	16
2.1.5	REACTIFS UTILISES POUR L'IMMOBILISATION ENZYMATIQUE	16
2.1.6	SELS ORGANIQUES CONDUCTEURS.....	17
2.1.7	AUTRES REACTIFS UTILISES.....	17
2.2	APPAREILLAGE.....	18
2.2.1	ELECTRODES.....	18
2.2.2	pH METRE / mV METRE.....	18
2.2.3	POTENTIOSTAT	18
2.2.4	ENREGISTREURS	18
2.2.5	SPECTROPHOTOMETRE.....	18
2.2.6	pH-STAT.....	19
2.3	METHODES.....	19
2.3.1	MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	19
2.3.1.1	AChE et BuChE.....	19
2.3.1.2	Pénicillinase	19
2.3.1.3	Uréase.....	20
2.3.2	REACTIONS AVEC LES ENZYMES IMMOBILISEES	22
2.3.3	PREPARATION DES HYDRAZIDES DU COPOLYMERE D'ACRYLAMIDE ET DE METHACRYLAMIDE	22
2.3.4	ESTIMATION DE LA CONCENTRATION EN ACYLHYDRAZIDE DU COPOLYMERE ..	24
2.3.5	IMMOBILISATION DE L'ENZYME ET PREPARATION DES BIOCAPTEURS.....	24
2.3.5.1	Biocapteur modifié par le TCNQ ⁻ -TTF ⁺	24
2.3.5.2	Biocapteur à membrane de polyamide pré-activée	25
2.3.5.3	Biocapteur à revêtement en copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide.....	27
2.3.5.4	Biocapteur à membrane en toile de Nylon TM	30
2.3.5.5	Biocapteur à uréase à nonactine	32
2.3.5.6	Biocapteur à glutaraldéhyde vaporisé.....	33

2.3.6	MESURES AMPEROMETRIQUES.....	34
2.3.6.1	Voltampérométrie cyclique	34
2.3.6.2	Mesure de courants stationnaires	36
2.3.7	MESURES POTENTIOMETRIQUES	36

3 - RESULTATS ET DISCUSSION

3.1	BIOCAPTEURS DE TYPE AMPEROMETRIQUE.....	39
3.1.1	BIOCAPTEUR TCNQ ⁻ -TTF ⁺ A AChE ET COD IMMOBILISEES.....	39
3.1.1.1	Electrochimie de l'électrode TCNQ ⁻ -TTF ⁺	39
3.1.1.2	Voltampérométrie cyclique	39
3.1.1.3	Choix du potentiel de travail	41
3.1.1.4	Dosage de l'ACh	41
3.1.1.5	Dosage de la nicotine.....	41
3.1.1.6	Stabilité.....	43
	Conclusions.....	43
3.2	BIOCAPTEURS DE TYPE POTENTIOMETRIQUE.....	44
3.2.1	BIOCAPTEUR A MEMBRANE EN POLYAMIDE PRE-ACTIVEE CHARGEE DE L'AChE.....	44
3.2.1.1	Préparation des membranes enzymatiques	44
3.2.1.2	Facteurs influençant l'immobilisation enzymatique	44
3.2.1.3	Membrane préparée par dépôt de goutte	48
3.2.1.4	Modifications du protocole de "dépôt de goutte"	49
3.2.1.5	Stabilité de la membrane dans les mesures en batch.....	50
3.2.1.6	Conditions opératoires pour le dosage de l'inhibiteur.....	51
3.2.1.7	Dosage des polluants toxiques.....	51
3.2.1.8	Reproductibilité.....	53
3.2.1.9	Stabilité des membranes stockées	53
	Conclusions.....	53
3.2.2	BIOCAPTEUR A HYDRAZIDE DU COPOLYMERE D'ACRYLAMIDE ET DE METHACRYLAMIDE CHARGE PAR DE L'AChE.....	55
3.2.2.1	Préparation et caractéristiques du copolymère.....	55

3.2.2.2	Choix du transducteur (Pd/PdO, Ir/IrO ₂ et verre).....	55
3.2.2.3	Réponse du capteur à l'ACh.....	57
3.2.2.4	Effet de la force ionique du tampon.....	59
3.2.2.5	Effet du pH du tampon.....	59
3.2.2.6	Conditions opératoires pour le dosage d'inhibiteur.....	60
3.2.2.7	Dosage des polluants toxiques	60
3.2.2.8	Régénération de l'enzyme.....	63
3.2.2.9	Stabilité du biocapteur.....	64
3.2.2.10	Reproductibilité	65
	Conclusions	65
3.2.3	BIOCAPTEURS A BUCHE POUR LE DOSAGE D'INHIBITEURS : COMPARAISON DE DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMMOBILISATION ENZYMATIQUE.....	67
3.2.3.1	Préparation de capteurs pour la mesure de la toxicité.....	67
3.2.3.2	Quantité d'enzyme utilisée	67
3.2.3.3	Conditions opératoires pour le dosage des inhibiteurs	67
3.2.3.4	Dosage du paraoxon, du carbaryl et du carbofurane	69
3.2.3.5	Reproductibilité du capteur	69
3.2.3.6	Stabilité du capteur.....	71
3.2.3.7	Coût de l'immobilisation.....	73
	Conclusions	73
3.2.4	BIOCAPTEUR A HYDRAZIDE DU COPOLYMERE D'ACRYLAMIDE ET DE METHACRYLAMIDE CHARGE PAR DE L'UREASE.....	75
3.2.4.1	Préparation du biocapteur à uréase.....	75
3.2.4.2	Conditions opératoires pour le dosage des ions ammonium et l'analyse de l'urée.....	75
3.2.4.3	Réponse aux ions ammonium	75
3.2.4.4	Réponse à l'urée	75
3.2.4.5	Dosage de l'urée dans des échantillons de sérum humain.....	77
3.2.4.6	Temps de réponse.....	78
3.2.4.7	Stabilité du biocapteur.....	78
	Conclusions	78

3.2.5	NOUVELLE TECHNIQUE D'IMMOBILISATION D'ENZYMES POUR LA MISE AU POINT D'ELECTRODES DE VERRE ENZYMATIQUES A REPONSE RAPIDE	79
3.2.5.1	Préparation des biocapteurs	79
3.2.5.2	Epaisseur de la membrane enzymatique	79
3.2.5.3	Temps de réponse	82
3.2.5.4	Réversibilité du biocapteur	82
3.2.5.5	Dosage des substrats (ACh, BuCh, pénicilline-V et urée).....	82
3.2.5.6	Stabilité du biocapteur	86
3.2.5.7	Activité spécifique de l'enzyme utilisée pour l'immobilisation.....	87
3.2.5.8	Estimation théorique de la quantité d'enzyme immobilisée.....	88
	Conclusions.....	91

4 - ANALYSE PAR INJECTION EN FLUX CONTINU (FIA)

4.1	RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	93
4.1.1	PRINCIPE.....	93
4.1.2	CARACTERISTIQUES D'UN SYSTEME FIA.....	93
4.1.3	APPLICATIONS	93
4.1.4	DOSAGE DES INHIBITEURS D'ENZYMES PAR FIA	95
4.1.4.1	Dosage des insecticides organophosphorés et des carbamates.....	95
4.1.4.2	Réactivation de l'enzyme	95
4.1.5	PRESENTATION DE L'ETUDE	95
4.2	MATERIELS ET METHODES	96
4.2.1	IMMOBILISATION D'ENZYME.....	97
4.2.2	DOSAGE DES GROUPEMENTS AMINES	98
4.2.3	MONTAGE DE LA FIA	99
4.2.3.1	Système porteur	100
4.2.3.2	Système d'injection	100
4.2.3.3	Réacteur tubulaire à une rangée de billes ("Single bead string reactor" - SBSR)	100
4.2.3.4	Détecteur.....	100
4.2.4	REACTION ENZYMATIQUE	101
4.2.5	DOSAGE DE L'INSECTICIDE.....	102

4.3	RESULTATS ET DISCUSSION.....	103
4.3.1	DETERMINATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	103
4.3.1.1	Débit et concentration de l'ACh	103
4.3.1.2	Longueur du réacteur.....	105
4.3.1.3	Concentration du tampon HEPES	106
4.3.1.4	pH	106
4.3.1.5	Température du bain du réacteur	107
4.3.1.6	Temps de contact entre l'enzyme et l'insecticide	107
4.3.1.7	Température d'inhibition.....	109
4.3.2	PERFORMANCES DU SYSTEME FIA	109
4.3.2.1	Dosage des insecticides dans de l'eau de mer synthétique	109
4.3.2.2	Réactivation du réacteur enzymatique	111
4.3.2.3	Reproductibilité et précision	113
4.3.2.4	Nombre d'échantillons traités	114
4.3.2.5	Stabilité.....	114
4.4	CONCLUSIONS.....	115
	CONCLUSION.....	117

INTRODUCTION

Le terme "**biocapteurs**" représente la fusion de deux des plus importantes technologies de ce siècle : l'électronique et les biotechnologies. Leur association permet des dosages rapides, sensibles et spécifiques, dans des systèmes aussi divers que l'intérieur du corps humain et les procédés en-ligne.

Cependant, l'utilisation quotidienne des biocapteurs n'est pas encore complètement acceptée. En effet, dans de nombreux cas, ces capteurs ne sont pas vraiment adaptés aux besoins des utilisateurs et c'est la raison pour laquelle la conception et la technologie des biocapteurs en sont encore au stade du développement. Les recherches continuent afin d'obtenir de meilleures techniques d'immobilisation des biocomposés, des transducteurs plus sensibles, des temps de réponses plus faibles, une minimisation des interférences, des amplifications du signal, une meilleure reproductibilité du signal, une plus forte stabilité du capteur, une biocompatibilité et de nombreux autres aspects, dans le but de répondre aux caractéristiques requises pour un capteur commercialisable.

Parmi les nombreuses applications des biocapteurs, **la surveillance de la qualité de l'environnement** est un secteur qui évolue significativement, et les recherches sur les biocapteurs au laboratoire de biotechnologie de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne, sont particulièrement bien placées dans ce domaine. Le travail présenté dans cette étude concerne, d'une part, *l'amélioration d'électrodes enzymatiques pour le dosage des composés toxiques en milieu aqueux et de substrats intéressant le domaine de la santé*, et d'autre part, *la mise au point d'un système d'analyse par injection en flux continu (FIA)*, particulièrement adapté au contrôle de l'environnement. Les éléments suivants ont été étudiés :

- *électrode ampérométrique à acétylcholinestérase chimiquement modifiée* pour le dosage de l'acétylcholine et de la nicotine ;
- *amélioration et comparaison de différentes techniques d'immobilisation d'enzyme* (membrane pré-activée en polyamide, en gel de copolymère et en Nylon™) pour le dosage de quelques inhibiteurs ;
- *électrode sélective à ammonium à nonactine* revêtue d'uréase pour le dosage de l'urée dans des échantillons de sérum humain ;
- *nouvelle technique d'immobilisation d'enzymes* (acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase, pénicillinase et uréase) en vue d'améliorer le temps de réponse pour le dosage de substrat ;
- *système FIA* pour le dosage des insecticides organophosphorés et des carbamates.

Après un rappel bibliographique sur les électrodes enzymatiques employées pour le dosage d'inhibiteurs, une description du matériel et des méthodes utilisés est donnée, puis les résultats et la discussion sont présentés. Un chapitre spécial est consacré au système FIA qui constitue une partie importante de cette étude.

CHAPITRE 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 LES BIOCAPTEURS

1.1.1 DEFINITION

Les biocapteurs sont des dispositifs analytiques fondés sur le couplage d'une substance bioactive, spécifique de l'espèce à détecter ou à doser, avec un transducteur physico-chimique fournissant un signal électrique de sortie qui peut être ultérieurement amplifié, stocké et visualisé [1].

La substance biologique de reconnaissance peut être une enzyme, une séquence d'enzymes, une lectine, un anticorps, une protéine membranaire réceptrice, un organelle, une bactérie, une cellule animale ou végétale ou une partie découpée de plantes ou de tissus animaux.

L'élément transducteur peut être classé en 4 types principaux : potentiométrique, ampérométrique, optique et autres systèmes [2].

Parmi les transducteurs utilisés dans les biocapteurs, les systèmes électrochimiques dominent [1]. Cette importance est montrée par le grand nombre de substances différentes déterminées, par les multiples publications, et par le niveau de commercialisation des électrodes biospécifiques.

1.1.2 PRINCIPE D'UN BIOCAPTEUR

La reconnaissance moléculaire peut être schématisée par le principe "serrure-clé" entre la surface du récepteur et la substance à reconnaître (Figure 1.1). Les changements physico-chimiques du récepteur dus à sa liaison avec la substance à déterminer sont transmis par des électrodes potentiométriques ou ampérométriques, des thermistors, des détecteurs opto-électroniques, des transistors à effet de champ électrique (F.E.T.), ou par d'autres systèmes, en un signal électrique de sortie.

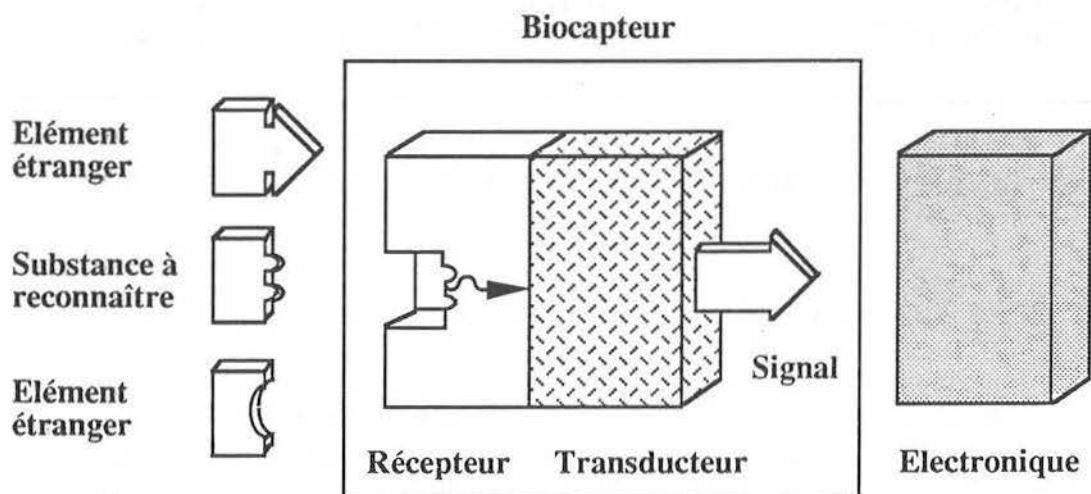


Figure 1.1 Configuration d'un biocapteur.

1.1.3 APPLICATIONS POTENTIELLES DES BIOCAPTEURS

On estime que les biocapteurs pourraient révolutionner plusieurs domaines de la chimie analytique, tels le domaine médical et vétérinaire, l'agriculture, la pétrochimie, les mines, la surveillance d'aires militaires et de la pollution, par la fourniture d'informations vitales, en temps réel, sur le niveau des paramètres clés [2]. La raison essentielle du développement des biocapteurs est venue, indubitablement, de la demande croissante des biotechnologies de la santé. La mesure de paramètres cliniques, dans un but thérapeutique, tels que les cations sanguins, les gaz et les métabolites, et, en particulier, la surveillance en continu par des biocapteurs implantables, sont les domaines d'intérêt majeurs.

Cependant, le nombre de biocapteurs actuellement commercialisés est relativement faible, comparé aux recherches et aux besoins. Le Tableau 1.1 présente une liste de biocapteurs à enzyme disponibles sur le marché aux Etats-Unis, en Europe et au Japon.

Sociétés	Appareillage	Substance Cible
Etats-Unis		
Baxter	ExacTech®	Glucose
Provesta Corp.	Bioanalyzer®	Glucose L-lactate
Universal Sensors	ABD®	Glucose
Yellow Springs Instrument	YSI 2000®, YSI3000®	Glucose L-lactate
Europe		
SGI (France)	Microzym-L®	Glucose L-lactate
Eppendorf (Allemagne)	Esat 6660®, Esat 6661®	Glucose L-lactate
Japon		
DKK	BOD Sensor	Pollution de l'eau
Fuji Electric	Gluco-20®	Acide urique
	UA-300®	Glucose
TOA	FGA-1®	Glucose (fermenteurs)
Toyobo	Diagluca®	Glucose L-lactate
Toyoko-Jozo/AIC	Glucoroder® PM-1000	Glucose (fermenteurs)

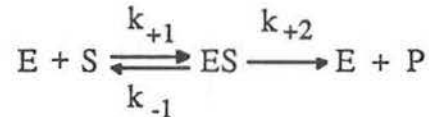
Tableau 1.1 Biocapteurs à enzyme commercialisés à l'heure actuelle.

1.2 LES ENZYMES COMME BIOCATALYSEURS

Une grande partie de la recherche a été orientée vers le développement des biocapteurs basés sur les enzymes comme agent de reconnaissance biologique. Le travail présenté dans cette étude est aussi centré sur l'utilisation des enzymes pour la construction de capteurs enzymatiques, employés soit pour le dosage de substrats, soit pour le dosage d'inhibiteurs d'enzymes.

1.2.1 CINETIQUES ENZYMATIQUES

La transformation d'un substrat en un produit, en présence d'une enzyme, peut être schématisée par la réaction suivante :



où,

E représente l'enzyme,

S, le substrat,

ES, le complexe enzyme-substrat,

P, le produit,

k_{+1} , k_{-1} et k_{+2} sont les constantes de la vitesse de la réaction.

Suivant la théorie de Michaelis et Menten qui suppose un état stationnaire pour ES, la vitesse de la réaction s'écrit :

$$V = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = V_M \left\{ \frac{[S]}{K_M + [S]} \right\} \quad (1)$$

où,

K_M est la constante de Michaelis ; $K_M = [(k_{-1} + k_{+2})/(k_{+1})]$,

V_M est la vitesse de réaction maximale. Pour $[S] \gg K_M$; $V_M = (k_{+2}[E_0])$,

$[E_0]$ est la concentration initiale de l'enzyme,

$[S]$ et $[P]$ sont respectivement la concentration du substrat et la concentration du produit.

Pour une enzyme donnée, la vitesse V est fonction du rapport $[S]/K_M$. Si $[S]/K_M$ tend vers 0, V tend vers $(V_M/K_M)[S]$: cinétique de premier ordre par rapport à $[S]$. Si $[S]/K_M$ augmente, V tend vers V_M : cinétique d'ordre zéro par rapport à $[S]$.

En présence d'inhibiteurs, la vitesse de la réaction enzymatique est réduite. L'inhibition de l'enzyme peut être classée en deux catégories principales : inhibition réversible et inhibition irréversible, selon que l'élimination de l'inhibiteur restaure ou non l'activité initiale de l'enzyme. Les inhibiteurs réversibles sont classés en :

- inhibiteurs compétitifs
- inhibiteurs non-compétitifs
- inhibiteurs anti-compétitifs.

Type d'inhibiteur	Mode d'action	Vitesse de la réaction enzymatique
Compétitif ou de type K	$ \begin{array}{c} S + E \xrightleftharpoons{K_s} ES \longrightarrow E + P \\ + \\ I \\ \updownarrow K_i \\ EI \end{array} $ <p>Inhibiteur et substrat se lient au même site actif.</p> $K_i = [E].[I]/[EI]$ $K_s = [E].[S]/[ES]$	<p>On pose: $r = 1 + [I]/K_i$</p> $v = V_m \frac{[S]}{r.K_m + [S]} = V_m \frac{[S]}{K'_m + [S]}$ <p>L'expression de la vitesse est du même type que celle de la réaction sans inhibiteur,</p> <p>en posant $K'_m = r.K_m$</p>
Non-Compétitif ou de type V	$ \begin{array}{ccc} S + E & \xrightleftharpoons{K_s} & ES \longrightarrow E + P \\ + & & + \\ I & & I \\ K_i \updownarrow & & \updownarrow K'_i \\ S + EI & \xrightleftharpoons{K_s} & ESI \end{array} $ <p>On suppose $K_i = K'_i$ l'inhibiteur se fixe sur un autre site que le site actif.</p> $K_i = [ES].[I]/[ESI] = [E].[I]/[EI]$	<p>Avec $r = 1 + [I]/K_i$</p> $v = \frac{V_m}{r} \frac{[S]}{K_m + [S]} = V'_m \frac{[S]}{K_m + [S]}$ <p>L'expression de la vitesse est du même type que celle de la réaction sans inhibiteur,</p> <p>en posant $V'_m = V_m/r$</p>
Anti-compétitif ou de type K,V	$ \begin{array}{c} S + E \xrightleftharpoons{K_s} ES \longrightarrow E + P \\ + \\ I \\ \updownarrow K_i \\ ESI \end{array} $ <p>L'inhibiteur se fixe sur le complexe enzyme-substrat.</p> $K_i = [ES].[I]/[ESI]$	<p>Avec $r = 1 + [I]/K_i$</p> $v = \frac{V_m}{r} \frac{[S]}{K_m/r + [S]} = V'_m \frac{[S]}{K'_m + [S]}$ <p>L'expression de la vitesse est du même type que celle de la réaction sans inhibiteur,</p> <p>en posant $V'_m = V_m/r$ et $K'_m = K_m/r$</p>

Tableau 1.2

Mode d'action des 3 types d'inhibiteurs classiques de systèmes enzymatiques.

Le mode d'action de ces différents types d'inhibiteurs réversibles est illustré dans le Tableau 1.2.

1.2.2 IMMOBILISATION DES ENZYMES

Pour les scientifiques, le problème essentiel posé par la construction d'un biocapteur est le couplage effectif du composant biologique au transducteur [3]. La qualité du procédé de couplage conditionne la stabilité du composé biologique et sa longévité en vue d'une application analytique.

Plusieurs méthodes d'immobilisation des enzymes ont été décrites dans la littérature [4-6]. Les principales possibilités d'immobilisation des enzymes sont :

- l'adsorption sur support inerte ;
- le piégeage physique dans des gels ;
- la microencapsulation ;
- la réticulation avec des réactifs bi ou multivalents ;
- la liaison covalente entre un porteur et des groupes fonctionnels de l'enzyme.

Dans toutes ces méthodes, l'activité biologique de l'enzyme est affectée par le procédé d'immobilisation.

1.2.3 EFFETS DE L'IMMOBILISATION DES ENZYMES

1.2.3.1 Sur la stabilité

Un des buts majeurs de l'immobilisation enzymatique, particulièrement pour des applications analytiques, est un accroissement de la durée de vie de l'enzyme. Dans de nombreux cas, la vitesse d'inactivation ou de dénaturation d'une enzyme immobilisée est inférieure à celle d'une enzyme libre [5].

1.2.3.2 Sur la cinétique

Les propriétés cinétiques d'une enzyme immobilisée ne sont pas parfaitement corrélées à celles de l'enzyme libre [6].

La diminution du transfert de masse du substrat dans le support résultant de l'immobilisation, augmente la valeur du K_M de l'enzyme. Il s'ensuit que le domaine correspondant à la cinétique de premier ordre de l'enzyme vis-à-vis du substrat est plus étendu.

De plus, l'orientation stérique de l'enzyme fait que le site actif ne peut être que partiellement accessible, voire inaccessible au substrat : en d'autres termes, l'enzyme est maintenue dans une conformation telle que la fonction catalytique est partiellement ou totalement bloquée.

Enfin, le microenvironnement de l'enzyme, tel qu'il est déterminé par le support lui-même, a une influence importante sur les paramètres cinétiques. Une explication de ce type de comportement serait une interaction du support lui-même avec le site actif.

Toutes les enzymes ont un pH optimum auquel elles présentent une vitesse de réaction maximale. Quand l'enzyme est immobilisée, le pH optimum peut se décaler suivant la nature et la charge positive ou négative du support. Par exemple, un support chargé négativement peut entraîner un pH de la couche enzymatique plus faible que celui du pH du milieu. En conséquence, on observe un décalage du pH optimum vers une zone plus alcaline pour compenser l'augmentation locale de la concentration en protons. On constate que l'effet est contraire pour un support chargé positivement.

1.3 LES ELECTRODES ENZYMATIQUES

La majorité des biocapteurs utilisent les enzymes comme système de reconnaissance biologique (système de réponse) lié à un appareillage électrochimique capable de répondre à des protons, des ions, des gaz ou des électrons générés durant le cycle catalytique [7]. Les électrodes à enzymes résultent de la combinaison de quelques types de capteurs électrochimiques avec une couche d'enzyme de 10 à 200 μm accolée à la surface active du transducteur. Le composé à doser est le plus souvent un substrat ou un produit issu de la réaction enzymatique [8].

Deux catégories de capteurs électrochimiques sont essentiellement rencontrées : les capteurs de type *potentiométrique* et ceux de type *ampérométrique*.

1.3.1 BIOCAPTEURS POTENTIOMETRIQUES

Les électrodes enzymatiques les plus courantes sont les biocapteurs potentiométriques, où une enzyme appropriée est immobilisée sur une électrode ionique sélective. Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel proportionnel au logarithme de l'activité de l'échantillon (loi de Nernst).

1.3.2 BIOCAPTEURS AMPEROMETRIQUES

En général, le système ampérométrique exploite l'échange d'électrons entre le système enzymatique et l'électrode. Il donne une réponse qui est directement proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

Les électrodes peuvent être chimiquement modifiées afin de résoudre les problèmes d'interférences des espèces électroactives. Leur intérêt provient d'un contrôle plus direct des caractéristiques de la surface de l'électrode ampérométrique [9].

La première génération de systèmes ampérométriques utilisait la consommation d'oxygène et la production d'eau oxygénée issues de l'oxydation de substrats par un nombre d'oxydases. De tels systèmes souffraient d'une dépendance de la concentration d'oxygène ambiant et d'interférences d'espèces électroactives présentes dans des échantillons bruts, aux potentiels de l'électrode requis pour l'échange d'électrons.

La seconde génération d'électrodes a apporté une solution à ces problèmes par l'utilisation de sels organiques conducteurs (métaux organiques en raison de leur comportement métallique et non semiconducteur) dans le but de faciliter le transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode. Des médiateurs tels que quinones, hexacyanoferrate, phénazine-méthosulfate, ferrocène, tétrathiafulvalène (TTF) et tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) ont été utilisés pour coupler l'enzyme redox - la glucose oxydase - à des électrodes appropriées.

Malgré la commercialisation de capteurs à médiateurs enzymatiques, la technologie des biocapteurs a rapidement évolué vers le domaine des systèmes de troisième génération dans lesquels les enzymes réduites réagissent "directement" avec l'électrode elle-même. A ce niveau, les sels organiques conducteurs tels que N-méthyl phénazine- tétracyanoquinodiméthane ($\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$) et tétracyanoquinodiméthane-tétrathiafulvalène ($\text{TCNQ}^-\text{TTF}^+$) permettent l'échange direct d'électrons avec les enzymes réduites. Cependant, le mécanisme d'action des sels organiques conducteurs est encore un sujet controversé [7].

1.4 ELECTRODES ENZYMATIQUES POUR LA DETERMINATION D'INHIBITEURS

Des électrodes enzymatiques pour l'estimation de substrats tels que le glucose [10-12], l'urée [13-15], la pénicilline [15-17], les acides aminés [18-19], les alcools [20-22], le lactate [23-25] et une multitude d'autres substances sont maintenant réalisées [26-29]. En plus de cette application majeure des électrodes enzymatiques, il a été possible de réaliser des électrodes utilisant la propriété de réduction de l'activité enzymatique par ses inhibiteurs, en vue d'analyser ceux-ci. La réduction du signal de réponse du biocapteur quand l'enzyme immobilisée est inhibée, est utilisée pour quantifier l'inhibiteur présent [30]. Des électrodes enzymatiques basées sur l'urée [31] et les cholinestérases [32-37] ont été conçues pour l'analyse d'une gamme de substances comme F^- , Ag^+ , Co^{2+} , Hg^{2+} , les pesticides (organophosphorés et carbamates) et autres composés organiques toxiques [38].

1.4.1 LES CHOLINESTERASES

Chez les vertébrés et les insectes, deux sortes d'enzymes hydrolysent la substance neurotransmettrice, l'acétylcholine (ACh) : d'une part, l'acétylcholinestérase (E.C.3.1.1.7 ; AChE) qui décompose l'acétylcholine à la membrane post-synaptique de la jonction neuromusculaire et, d'autre part, la butyrylcholinestérase (E.C.3.1.1.8 ; BuChE), qui hydrolyse l'acétylcholine ainsi que d'autres esters, sans fonction physiologique connue. Cette

butyrylcholinestérase est aussi appelée pseudo-cholinestérase, cholinestérase non-spécifique ou simplement cholinestérase [39].

Le site catalytique de l'AChE comprend le groupement hydroxyle de la sérine qui réagit avec l'ACh, au cours de la réaction enzymatique. L'hydrolyse de l'ACh par l'enzyme en produits inactifs, choline et acide acétique [40] est indiquée dans la réaction schématisée sur la Figure 1.2.

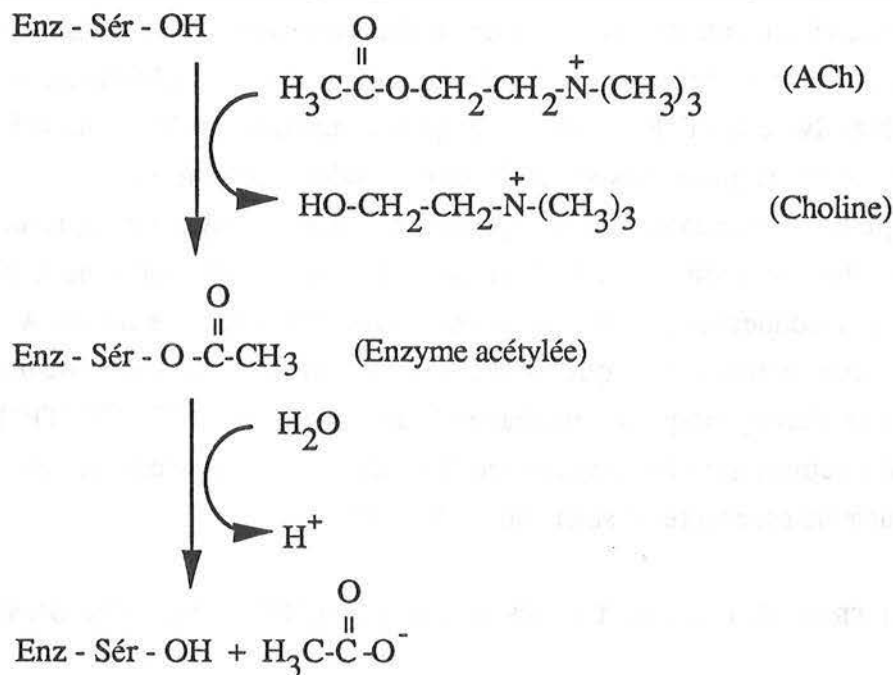


Figure 1.2 Mécanisme catalytique de l'acétylcholinestérase.

La spécificité des cholinestérases pour les substrats vient de la présence d'un site anionique qui se lie à la choline résiduelle durant l'hydrolyse des esters de la choline.

1.4.2 LES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORES ET LES CARBAMATES

Les insecticides organophosphorés et les carbamates sont toxiques pour les insectes et les mammifères par leurs capacités à inactiver l'enzyme AChE [41]. Ils présentent une large variété de structures ayant différentes propriétés physiques et chimiques. La toxicité de ces composés sur les insectes et les mammifères est déterminée par de nombreux facteurs liés à leur absorption. Ces insecticides sont ensuite transférés au site catalytique où ils bloquent l'enzyme et provoquent ainsi l'empoisonnement.

La Figure 1.3 présente la structure générale des insecticides organophosphorés. R est un groupement méthyl ou éthyl ; R' peut être un groupement méthoxy, un groupement éthoxy, un éthyl, un phényl, une amine, une amine substituée ou un groupement thio-alkyl. X est un groupement réactif facilement dissociable au cours de la réaction avec l'enzyme.

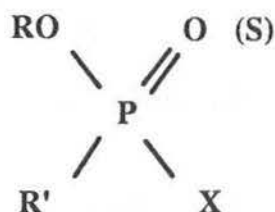


Figure 1.3 Structure générale des insecticides organophosphorés .

La structure générale des insecticides méthylcarbamates est présentée sur la Figure 1.4 où X est un groupement aryl-oxy ou une partie oxime.

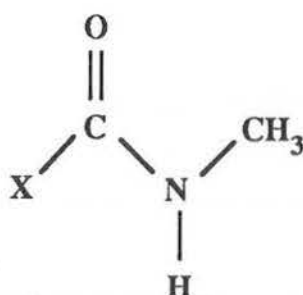


Figure 1.4 Structure générale des insecticides méthylcarbamates.

1.4.3 MECANISME D'INHIBITION

Il a été clairement démontré que l'inactivation de l'AChE résulte d'une réaction chimique entre l'enzyme et l'ester organophosphoré ou les carbamates [42-43]. Quand l'enzyme est phosphorylée ou carbamylée, elle n'est plus capable d'effectuer l'hydrolyse de l'ACh et il se produit une accumulation de cette substance neurotransmettrice à la synapse nerveuse ou à la jonction neuro-musculaire. Cela entraîne une stimulation continue du muscle ou de la fibre nerveuse, conduisant éventuellement à la fatigue, voire à la tétanie.

1.4.3.1 Inhibition par un organophosphate

L'inhibition de l'AChE par un ester organophosphoré a lieu par l'intermédiaire d'une réaction chimique dans laquelle la partie hydroxyle de la sérine est phosphorylée au niveau du site actif de l'enzyme, d'une manière analogue à la réaction d'acétylation de l'AChE, déjà présentée sur la Figure 1.2.

Par rapport à l'enzyme acétylée, qui est rapidement régénérée en libérant de l'acide acétique, l'enzyme phosphorylée est très stable. Dans quelques cas, selon les groupements fixés à l'atome de phosphore (R et R'), elle est inhibée irréversiblement. Le groupement hydroxyle de la sérine, bloqué par un groupement phosphoryle n'est plus capable de participer à l'hydrolyse de l'ACh. La réaction d'inhibition a lieu en deux étapes comme indiqué dans la Figure 1.5.

1.4.4 DETERMINATION DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORES ET DES CARBAMATES

Le mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les insecticides organophosphorés et les carbamates, est caractéristique de l'empoisonnement des enzymes du système nerveux. Aussi, de nombreuses techniques analytiques pour l'identification et la quantification de ces insecticides, sont basées sur l'inhibition des cholinestérases [44-46]. Leur principal inconvénient réside dans la durée très longue de l'analyse. L'inhibition des cholinestérases *in vitro* en présence de très faibles concentrations d'esters organophosphorés ou d'esters de carbamates est lente. Elle nécessite au moins 30 minutes, et l'analyse peut durer plusieurs heures [36]. Ce temps de contact enzyme-inhibiteur peut être cependant réduit à un minimum par l'utilisation de faibles concentrations d'enzymes. Ceci permet également la détection de très faibles concentrations de composés inhibiteurs.

1.4.5 REACTIVATION DES CHOLINESTERASES INHIBEES

La régénération des cholinestérases inhibées par des organophosphates a été étudiée très largement par de nombreux auteurs et est maintenant bien connue [47-50]. L'enzyme peut être réactivée en traitant le complexe enzyme-inhibiteur à l'aide de réactifs chimiques ayant une affinité nucléophile pour le phosphore, en substituant l'atome de phosphore de l'enzyme par un agent chimique [51-52]. L'hydroxylamine et la plupart de ses dérivés, en particulier les acides hydroxamiques et les oximes, restaurent l'activité de l'enzyme inhibée. La Figure 1.7 présente le schéma réactionnel de la réactivation de l'AChE inhibée par un organophosphate à l'aide d'iodure de méthyl - 1 aldoxime - 2 pyridine (PAM).

D'autres oximes utilisées pour la réactivation de l'AChE inhibée par un organophosphate sont le TMB-4 (1,1'-triméthylène-bis(4-formyl-pyridinium bromure) dioxime) et le MINA (monoisonitroso-acétone) [53].

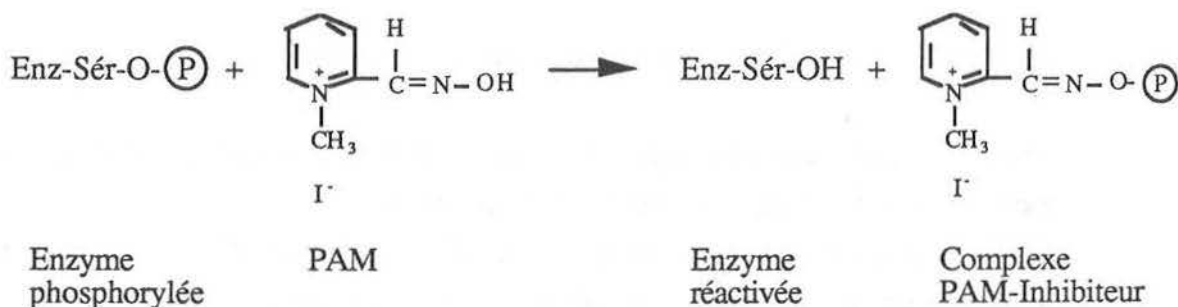


Figure 1.7 Réactivation par le PAM de la cholinestérase inhibée par un organophosphate .

Alors qu'il est possible d'induire la réactivation de l'AChE phosphorylée par des oximes et des acides hydroxamiques, il existe aussi des réactivations spontanées de l'activité de l'AChE [54] par hydrolyse douce de l'enzyme phosphorylée, selon le schéma réactionnel suivant :



La vitesse de cette réaction en milieu aqueux dépend de la configuration électronique et de la charge autour de l'atome de phosphore.

1.5 OBJECTIFS DE CETTE ETUDE

Malgré tout le travail accompli, à la fois, sur les aspects fondamentaux et les applications des biocapteurs, il reste encore beaucoup à faire pour satisfaire les besoins initiaux.

Dans cette optique, les recherches continuent encore dans les domaines suivants :

- biocompatibilité
- techniques d'immobilisation plus efficaces
- minimisation des interférences
- stabilité du capteur
- reproductibilité des mesures
- meilleurs temps de réponse
- systèmes de transduction plus performants
- amplification du signal
- simplicité d'utilisation
- réduction du coût.

Le travail présenté dans cette étude porte essentiellement sur la réalisation d'électrodes enzymatiques pour le dosage, à la fois, des substrats et des inhibiteurs d'enzymes. L'utilisation d'un système d'analyse par injection en flux continu (FIA) pour le dosage de certains insecticides basé sur l'inhibition d'enzyme est également étudiée.

Les objectifs de cette étude peuvent être définis comme suit :

- examiner l'utilisation d'une électrode enzymatique ampérométrique chimiquement modifiée pour le dosage de substrats et d'inhibiteurs ;
- étudier et améliorer certaines des techniques d'immobilisation d'enzyme existantes et les comparer entre elles pour leur utilisation dans le dosage d'inhibiteur ;
- rechercher l'utilisation d'électrode sélective à ammonium à nonactine pour le dosage de l'urée dans le sérum humain ;
- mettre au point une nouvelle technique d'immobilisation en vue d'améliorer le temps de réponse du biocapteur ;
- développer l'utilisation d'un système FIA pour le dosage d'inhibiteur.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1 PRODUITS CHIMIQUES

2.1.1 ENZYMES

Acétylcholinestérase (E.C. 3.1.1.7.) : Sigma[®], poudre lyophilisée, provenant du poisson électrique, activité indiquée : 820 Unités.mg⁻¹ de solide, où 1 unité hydrolyse 1 µmol d'acétylcholine en choline et en acétate par minute, à pH 8,0 et à 37°C.

Butyrylcholinestérase (E.C. 3.1.1.8.) : Sigma[®], poudre lyophilisée, provenant de sérum de cheval, activité indiquée : 12 ou 255 Unités.mg⁻¹ de solide, où 1 unité hydrolyse 1 µmol de butyrylcholine en choline et en butyrate par minute, à pH 8,0 et à 37°C.

Choline oxydase (E.C.1.1.3.17.) : Sigma[®], provenant d'*Arthrobacter globiformis*, activité indiquée : 14 Unités.mg⁻¹ de solide, où 1 unité libère 1 µmol de H₂O₂ à partir de choline et d'eau par minute, à pH 8,0 et à 37°C.

Pénicillinase (E.C. 3.5.2.6.) : Sigma[®], poudre lyophilisée, provenant de *Bacillus cereus*, activité indiquée : 357 Unités.mg⁻¹ de solide, où 1 unité hydrolyse 1 µmol de benzylpénicilline en acide benzylpénicilloïque par minute, à pH 7,0 et à 25°C.

Uréase (E.C. 3.5.1.5.) : Sigma[®], poudre cristalline, provenant de *Canavalia ensiformis*, activité indiquée : 53 Unités.mg⁻¹ de solide, où 1 unité libère 1 µmol de NH₃ à partir de l'urée par minute, à pH 7,0 et à 25°C.

2.1.2 SUBSTRATS

Les substrats des enzymes mentionnées ci-dessus pour le dosage de leur activité enzymatique respective ou pour l'élaboration des courbes d'étalonnage des substrats sont les suivants :

ASChI (Sigma [®])	M.M. = 289,20 g.mol ⁻¹
AChCl (Sigma [®])	M.M. = 181,70 g.mol ⁻¹
BuSChI (Fluka [®])	M.M. = 301,17 g.mol ⁻¹
BuChCl (Sigma [®])	M.M. = 209,70 g.mol ⁻¹
Pénicilline-V (Sigma [®])	M.M. = 388,50 g.mol ⁻¹
Urée (Sigma [®])	M.M. = 60,06 g.mol ⁻¹

2.1.3 INHIBITEURS

Les inhibiteurs d'enzymes utilisés dans les tests sont :

Carbaryle (Riedel de-Haën®).....	M.M. = 201,22 g.mol ⁻¹
Carbofurane (Riedel de-Haën®)	M.M. = 221,26 g.mol ⁻¹
Méthyl Azinphos (Riedel de-Haën®).....	M.M. = 317,33 g.mol ⁻¹
Méthyl Parathion (Riedel de-Haën®).....	M.M. = 263,21 g.mol ⁻¹
Malathion (Riedel de-Haën®)	M.M. = 330,36 g.mol ⁻¹
Sulfate de nicotine (Sigma®)	M.M. = 422,60 g.mol ⁻¹
Paraoxon (Riedel de-Haën®).....	M.M. = 275,20 g.mol ⁻¹
Paraquat (Riedel de-Haën®).....	M.M. = 311,21 g.mol ⁻¹
Fluorure de sodium (Merck®).....	M.M. = 41,99 g.mol ⁻¹
2,4,6, trichlorophénol (Riedel de-Haën®).	M.M. = 197,45 g.mol ⁻¹

2.1.4 REACTIVATEUR

La réactivation de l'ACHé inhibée est faite par le 2-PAM (M.M. = 264,10 g.mol⁻¹) provenant de Sigma®.

2.1.5 REACTIFS UTILISES POUR L'IMMOBILISATION ENZYMATIQUE

Les réactifs utilisés pour l'immobilisation des enzymes par réticulation chimique sont le glutaraldéhyde (Sigma®) en solution aqueuse à 25 % (m/v) et l'ASH à 20 % (m/v) fournie par le Centre National de Transfusion Sanguine de Lyon.

Les réactifs utilisés pour la préparation de l'hydrazide du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide et l'immobilisation de l'enzyme par piégeage dans le gel de polymère sont définis ci-dessous :

Acrylamide (Prolabo®).....	M.M. = 71,08 g.mol ⁻¹
Méthacrylamide (Aldrich®).....	M.M. = 85,11 g.mol ⁻¹
Hydrate d'hydrazine	
(64% d'hydrazine)Sigma®	M.M. = 59,06 g.mol ⁻¹
TEMED (Fluka®).....	M.M. = 116,21 g.mol ⁻¹
PSA (Sigma®)	M.M. = 228,20 g.mol ⁻¹
Glyoxal (Sigma®)	40 % (m/v) en solution aqueuse

2.1.6 SELS ORGANIQUES CONDUCTEURS

En général, les sels organiques conducteurs sont préparés par combinaison d'un donneur et d'un accepteur d'électrons. Les composés utilisés dans les tests présentés sont le donneur tétrathiafulvalène (TTF) et l'accepteur tétracyanoquinodiméthane (TCNQ).

TCNQ (Aldrich®)	M.M. = 204,19 g.mol ⁻¹
TTF (Aldrich®)	M.M. = 204,36 g.mol ⁻¹

Ces espèces sont des molécules planes avec un nuage électronique π délocalisé [55]. Leurs structures sont présentées sur la Figure 2.1.

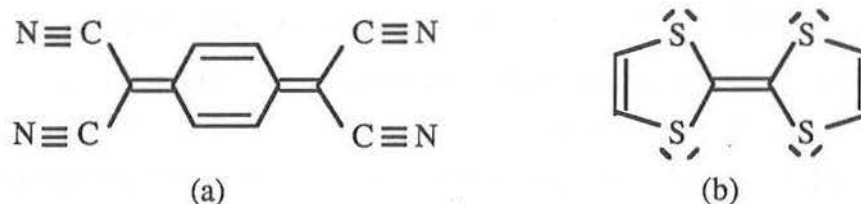


Figure 2.1 Configuration des molécules (a) de l'accepteur TCNQ et (b) du donneur TTF.

2.1.7 AUTRES REACTIFS UTILISES

Tampon phosphate :

NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (Prolabo®)	M.M. = 156,01 g.mol ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (Merck®)	M.M. = 177,99 g.mol ⁻¹
Tampon HEPES (Aldrich®)	M.M. = 238,31 g.mol ⁻¹
Base Trizma® (Sigma®)	M.M. = 121,10 g.mol ⁻¹
DTNB (Sigma®)	M.M. = 396,40 g.mol ⁻¹
Perchlorate de potassium (Aldrich®)	M.M. = 138,55 g.mol ⁻¹
Azoture de sodium (Prolabo®)	M.M. = 65,01 g.mol ⁻¹
Nonactine (<i>Streptomyces tsusimaensis</i>) ...	Sigma®
Tris (2-éthylhexyl) phosphate (Fluka®) ...	M.M. = 744,04 g.mol ⁻¹
Résine époxy (Ciba-Geigy®)	AY 103 et HY 956
Résine époxy Scotch Cast (3 M®)	Résine 4
Résine chargée en argent (Elecolit®)	336 A et B
Poudre graphite (Merck®)	< 50 μ m
Gélatine de peau porcine	Sigma®
Eau de brome (Aldrich®)	M.M. = 159,82 g.mol ⁻¹
TNBS (Sigma®)	Approx.95 %, 5 % soln.aq.

PAAH (Sigma®)..... 900 µmol acylhydrazide.g⁻¹ polymère
 Sels : NaCl, MgCl₂, (Prolabo®)
 Alcools : méthanol, éthanol (Carlo Erba®)

L'eau qui est utilisée pour la préparation des solutions et pour le nettoyage approprié des électrodes est de l'eau Milli Q® ultrapure.

2.2 APPAREILLAGE

2.2.1 ELECTRODES

Les électrodes utilisées dans les mesures potentiométriques sont des électrodes de pH en verre (Radiometer® G202B, Tacussel® type XG-160) et des électrodes à pCO₂ (Radiometer® E5036-O), utilisées comme électrodes de pH. Les électrodes de référence utilisées à la fois dans les tests ampérométriques et potentiométriques sont toutes de type calomel saturé ECS (Radiometer® K401 et Tacussel® type XR-100). La contre-électrode utilisée dans les mesures ampérométriques est un fil de platine (Tacussel® type XM-100).

2.2.2 pH METRE / mV METRE

Les mesures de pH et les changements de potentiel dans les tests potentiométriques sont lus sur un pH mètre Radiometer® de type pHM 64.

2.2.3 POTENTIOSTAT

Les mesures de courant sont effectuées par un potentiostat Tacussel® de type PRT 20-2X.

2.2.4 ENREGISTREURS

Un enregistreur de type SEFRAM à 2 canaux est utilisé pour les tests potentiométriques, alors qu'un traceur SEFRAM de type TGM 164, est utilisé pour enregistrer les voltampérogrammes dans les tests ampérométriques.

2.2.5 SPECTROPHOTOMETRE

Un spectrophotomètre U.V./visible (Kontron-Uvikon® de type 860) et des cuves en quartz (Hellma 100 QS) avec un trajet optique de 10 mm, sont utilisés pour la mesure de l'activité enzymatique en phase homogène.

2.2.6 pH-STAT

Les mesures d'activités enzymatiques sont également effectuées par utilisation d'un Vidéotitracteur Radiometer® VIT 90 couplé à une autoburette ABU 91.

2.3 METHODES

2.3.1 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

2.3.1.1 AChE et BuChE

Les activités de l'AChE et de la BuChE sont testées par spectrophotométrie (méthode d'Ellman) afin de déterminer les quantités requises pour effectuer les immobilisations. Les substrats utilisés dans ces deux cas sont, soit de l'iodure d'acétyl thiocholine (pour AChE), soit de l'iodure de butyryl thiocholine (pour BuChE), qui sont hydrolysés respectivement en acide acétique ou acide butyrique et en thiocholine. En présence de DTNB, la thiocholine est transformée en acide thionitrobenzoïque, qui absorbe à 410 nm. Les activités des enzymes sont calculées à partir de la vitesse de formation de l'acide thionitrobenzoïque. La Figure 2.2 représente les réactions d'hydrolyse, par exemple, celle de la BuSChI par la BuChE.

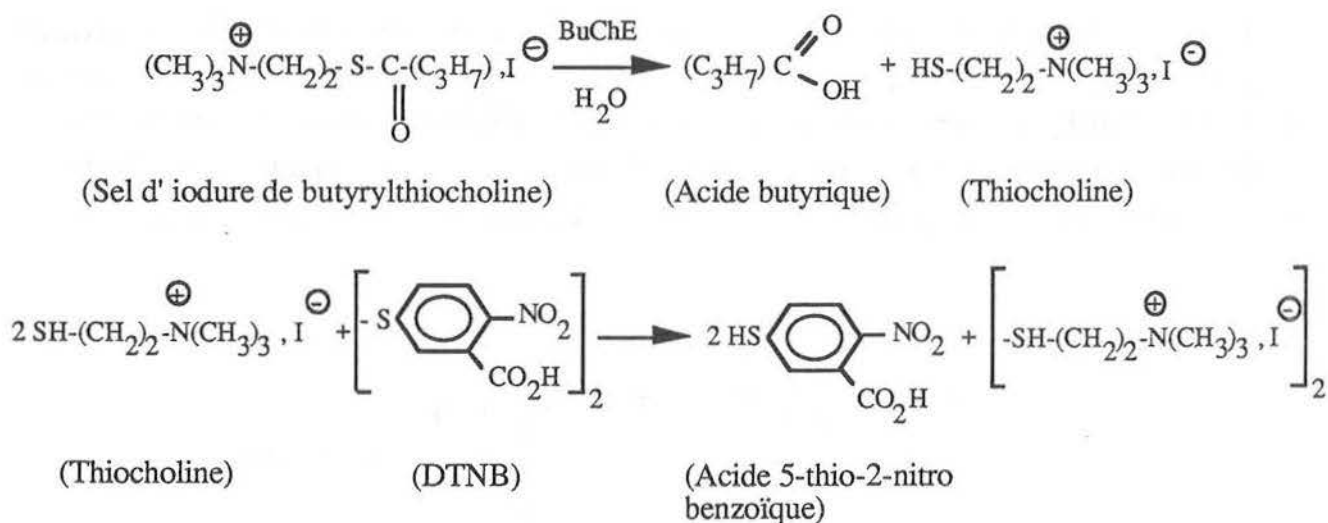


Figure 2.2 Hydrolyse de la butyrylthiocholine par la BuChE dans le test d'Ellman.

2.3.1.2 Pénicillinase

L'activité de la pénicillinase est déterminée par le pH-stat. L'enzyme catalyse l'hydrolyse du sel de potassium de l'acide phénoxyéthyl pénicillinique (pénicilline-V) en acide pénicilloïque. Cet acide est neutralisé par de la soude 1 mM de façon à maintenir un pH constant de 7,0. La mesure de débit de la soude permet de calculer l'activité de l'enzyme. La réaction de

transformation de la pénicilline-V en acide pénicilloïque correspondant est présentée dans la Figure 2.3.

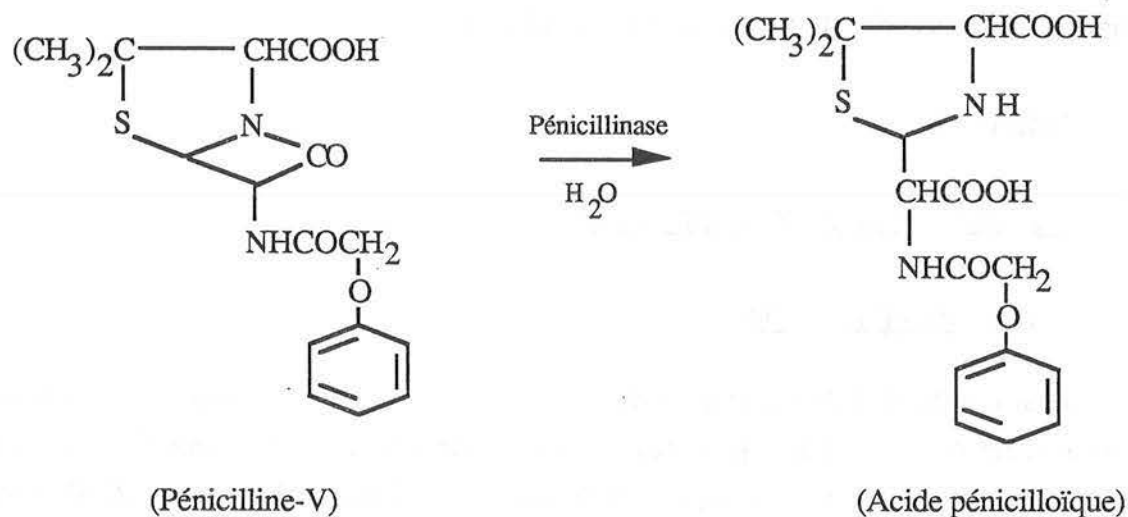


Figure 2.3 Hydrolyse de la pénicilline-V en acide pénicilloïque par la pénicillinase.

2.3.1.3 Uréase

L'activité de l'uréase est dosée par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Nessler (iodure de mercure et de potassium). La réaction catalysée par l'enzyme est réalisée pendant exactement 10 secondes, avant d'être arrêtée par addition d'acide trichloroacétique. Le réactif de Nessler est ajouté pour former un complexe coloré avec le NH_3 libéré dans la réaction, qui absorbe à 405 nm. La quantité de NH_3 libéré, et par conséquent, l'activité enzymatique, sont calculées à partir d'une courbe standard pour le NH_3 . La Figure 2.4 décrit les réactions importantes.

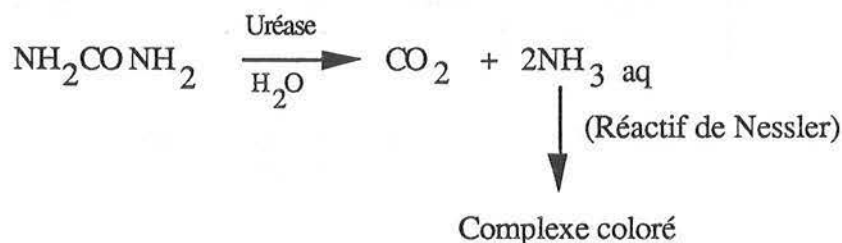


Figure 2.4 Hydrolyse de l'urée en gaz carbonique et en ammoniacque par l'uréase.

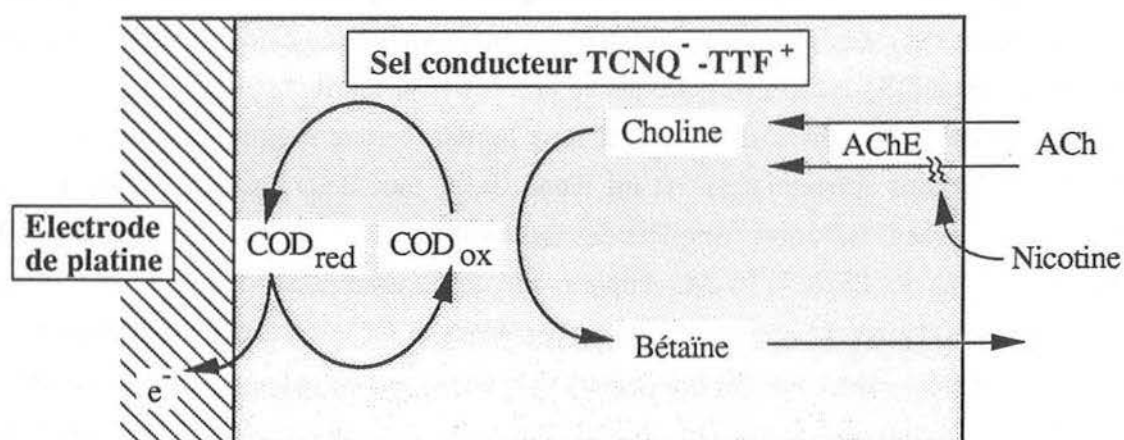
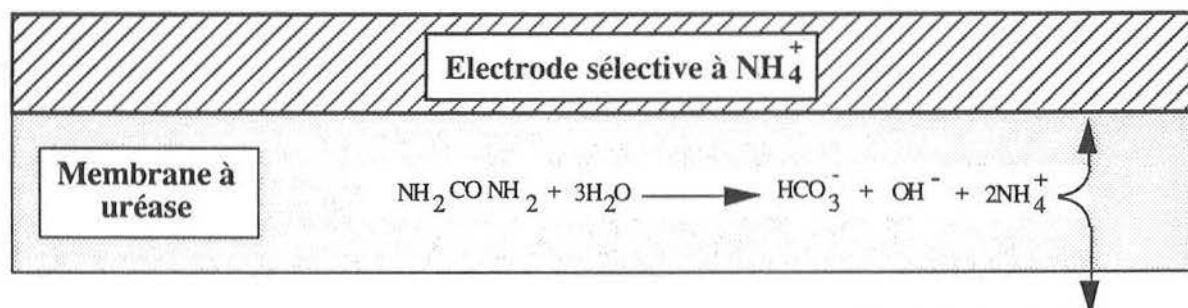
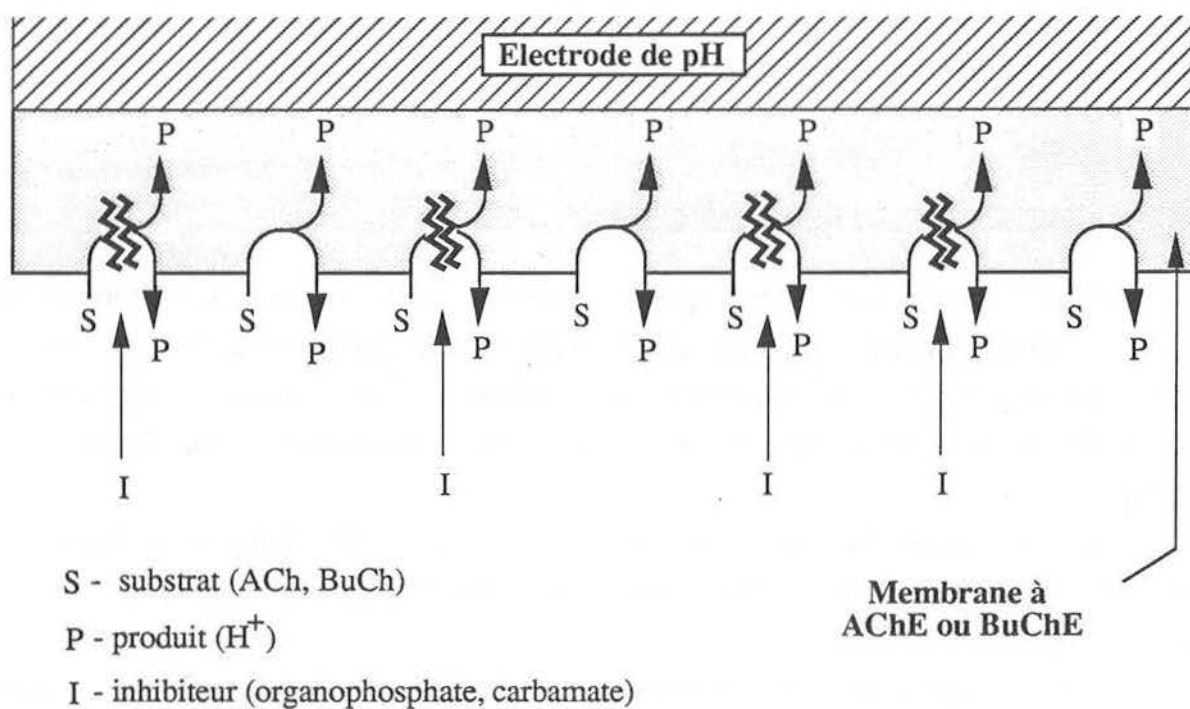


Figure 2.5 Diverses réactions se produisant à la surface des électrodes réalisées.

L'activité enzymatique est exprimée en Unités Internationales (UI), où 1 UI catalyse la transformation de 1 μmol des substrats, mentionnés ci-dessus, par minute, à 25 °C.

2.3.2 REACTIONS AVEC LES ENZYMES IMMOBILISEES

Pour la construction des biocapteurs enzymatiques, des enzymes sont immobilisées sur des électrodes capables de mesurer les produits formés dans la réaction catalysée par l'enzyme. Ainsi les hydrolases (AChE, BuChE, pénicillinase et uréase) sont immobilisées sur des électrodes de pH car elles libèrent des produits qui modifient le pH du milieu environnant la membrane enzymatique.

L'uréase qui hydrolyse l'urée pour donner du gaz carbonique et de l'ammoniac (dissous dans la solution), est immobilisée sur une électrode sélective aux ions ammonium, pour suivre cette réaction.

De façon à contrôler ampérométriquement la réaction avec l'AChE, la Choline Oxydase (COD) pourrait être co-immobilisée avec l'AChE (selon la méthode définie dans le chapitre 1 pour les électrodes modifiées à TCNQ⁻-TTF⁺). La COD est une enzyme rédox : elle oxyde la choline produite par la réaction catalysée par l'AChE.

Les différentes réactions catalysées par ces enzymes à la surface des biocapteurs, sont schématisées sur la Figure 2.5.

2.3.3 PREPARATION DES HYDRAZIDES DU COPOLYMERE D'ACRYLAMIDE ET DE METHACRYLAMIDE

La préparation des hydrazides du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide et leur utilisation pour l'immobilisation de nombreuses enzymes sur les électrodes de verre, ont été présentées récemment [15]. Nous avons adopté ce procédé déjà décrit.

Dans un ballon de 250 ml, placé sous agitation magnétique, dans un bain-marie maintenu à 40°C, nous introduisons 30 ml d'eau, 0,06 mol d'acrylamide et 0,026 mol de méthacrylamide. Après dissolution complète des monomères, nous ajoutons 10,3 ml de TEMED 0,092 M et 30,7 ml d'APS 0,0175 M. Auparavant, nous nous assurons que la solution de TEMED est limpide et incolore et que l'APS n'est pas dégradé. Ce dernier est broyé en poudre fine et laissé une nuit entière dans un dessiccateur sous vide contenant un gel de silice déshydraté.

La polymérisation est menée pendant 2 heures à 40°C ; la température est ensuite portée à 50°C. Puis, nous ajoutons successivement 82 ml d'eau et 48 ml d'hydrate d'hydrazine (concentration finale : 4,75 M). La réaction d'hydrazinolyse est effectuée pendant 3 heures. La Figure 2.6 montre les réactions de polymérisation et d'hydrazinolyse.

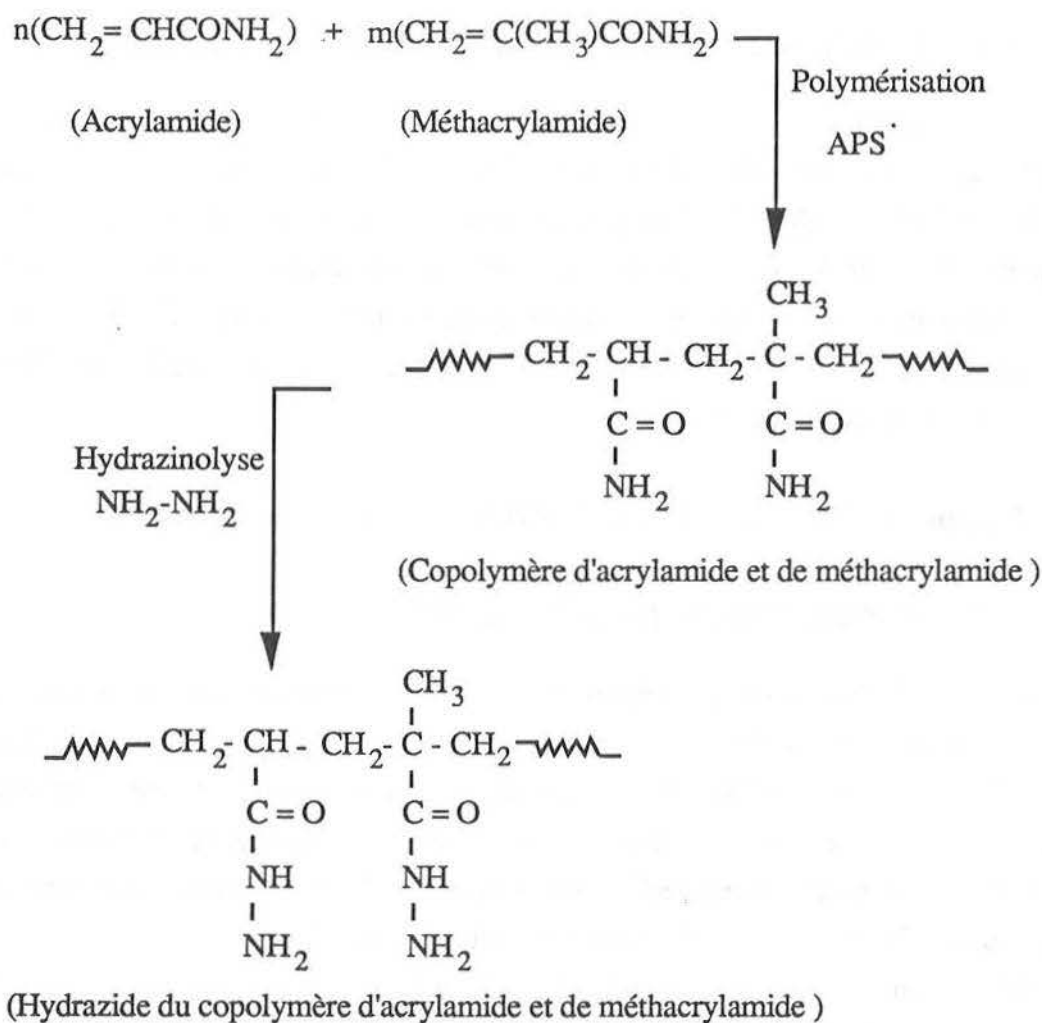


Figure 2.6 Réactions de la copolymérisation et de l'hydrazinolyse.

Le dérivé résultant du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide est ensuite refroidi dans un bain de glace. Il est précipité par addition goutte à goutte dans un litre de méthanol maintenu au froid dans un bain de glace et agité par l'intermédiaire d'un barreau magnétique (40 tr/min). Nous laissons le précipité pendant une heure dans son lit de glace avant de le séparer par centrifugation à 4°C (centrifugeuse Jouan CR 4 11 à 2000 rpm).

Le précipité est alors redissous dans 70 ml d'eau, précipité une nouvelle fois dans du méthanol froid, centrifugé puis stocké une nuit à 4°C dans du méthanol. Enfin, le polymère est séché sous vide jusqu'à l'obtention d'une poudre blanche.

Le polymère sec est stocké dans un récipient hermétiquement clos à -18°C jusqu'à son utilisation.

2.3.4 ESTIMATION DE LA CONCENTRATION EN ACYLHYDRAZIDE DU COPOLYMERE

Nous utilisons une méthode déjà décrite dans la littérature [56]. Nous introduisons 1 ml de notre solution aqueuse de polymère ($0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$) dans un mélange contenant 1 ml d'une solution de TNBS 1 mM et 3 ml de tampon phosphate de sodium 10 mM, à pH 7,5. Nous ajoutons ensuite 100 μl de NaOH 5 M et nous laissons incuber pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance du mélange est ensuite mesurée à 495 nm et corrélée à la quantité de groupes acylhydrazide, après avoir mesuré l'absorbance d'un échantillon de PAAH de concentration connue en acylhydrazide.

2.3.5 IMMOBILISATION DE L'ENZYME ET PREPARATION DES BIOCAPTEURS

2.3.5.1 Biocapteur modifié par le TCNQ^- - TTF^+

Le sel de TCNQ^- - TTF^+ est préparé par réaction directe entre un donneur non-chargé et un accepteur dans de l'acétonitrile chaud [57]. Des quantités équimolaires (environ 0,1 mol) de TCNQ et de TTF dans de l'acétonitrile anhydre chaud, sont mélangées pour former immédiatement une poudre microcristalline noire. Les cristaux sont ensuite lavés dans de l'acétonitrile froid, puis dans de l'éthoxy-éthane et finalement séchés sous vide. Jusqu'à son utilisation, le complexe séché est placé dans un dessiccateur sous vide, à l'abri de la lumière et réfrigéré.

Les électrodes de travail utilisées dans les tests ampérométriques sont fabriquées à partir d'un disque de platine ($\phi = 5 \text{ mm}$, épaisseur = 0,2 mm) collé à l'extrémité d'un tube en PTFE ($\phi_{\text{ext}} = 4,8 \text{ mm}$), à l'aide de résine époxy. La face interne du disque de platine est soudée à un fil de platine ($\phi = 0,127 \text{ mm}$, $L = 120 \text{ mm}$) en utilisant une résine époxy chargée en poudre d'argent métallique. La face externe est ensuite recouverte par dépôt d'une goutte de solution saturée du complexe TCNQ^- - TTF^+ dissous dans du THF (méthode de "drop-coating"). Après évaporation du solvant à température ambiante, l'électrode est séchée sous un flux d'azote pendant 1 heure.

L'AChE et la COD sont immobilisées sur des électrodes modifiées au TCNQ^- - TTF^+ en utilisant les hydrazides du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide. La solution enzyme-copolymère est préparée de la façon suivante :

Dans 1 ml d'une solution aqueuse de copolymère à 30 % (m/v) nous ajoutons successivement :

- 100 μl d'une solution d'AChE (dosée à 1000 UI.ml^{-1}) dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,0, contenant 0,1 % (m/v) de gélatine,
- 100 μl d'une solution de COD (dosée à 1000 UI.ml^{-1}) dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,0, contenant 0,1 % (m/v) de gélatine,
- 50 μl d'une solution tampon phosphate de sodium 2 M à pH 7,5,
- 10 μl d'une solution à 1 % (m/v) de gélatine dans de l'eau,

- 10 μl d'eau.

La concentration finale d'AChE et de COD dans la solution enzyme-copolymère est approximativement de 75 UI.ml^{-1} pour chaque enzyme.

L'électrode à $\text{TCNQ}^- - \text{TTF}^+$ est recouverte avec la solution enzyme-copolymère et puis nous procédons à une réticulation dans du glyoxal froid par une méthode similaire à celle utilisée pour le revêtement des électrodes de pH en verre et décrite ci-dessous dans le § 2.3.5.3 (a). La Figure 2.7 présente l'électrode à disque de platine recouverte du complexe $\text{TCNQ}^- - \text{TTF}^+$ et du gel copolymérisé contenant l'AChE et la COD.

Le tampon de travail utilisé pour le biocapteur $\text{TCNQ}^- - \text{TTF}^+$ est le tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,2, contenant 0,1 M de perchlorate de potassium, utilisé comme électrolyte de support.

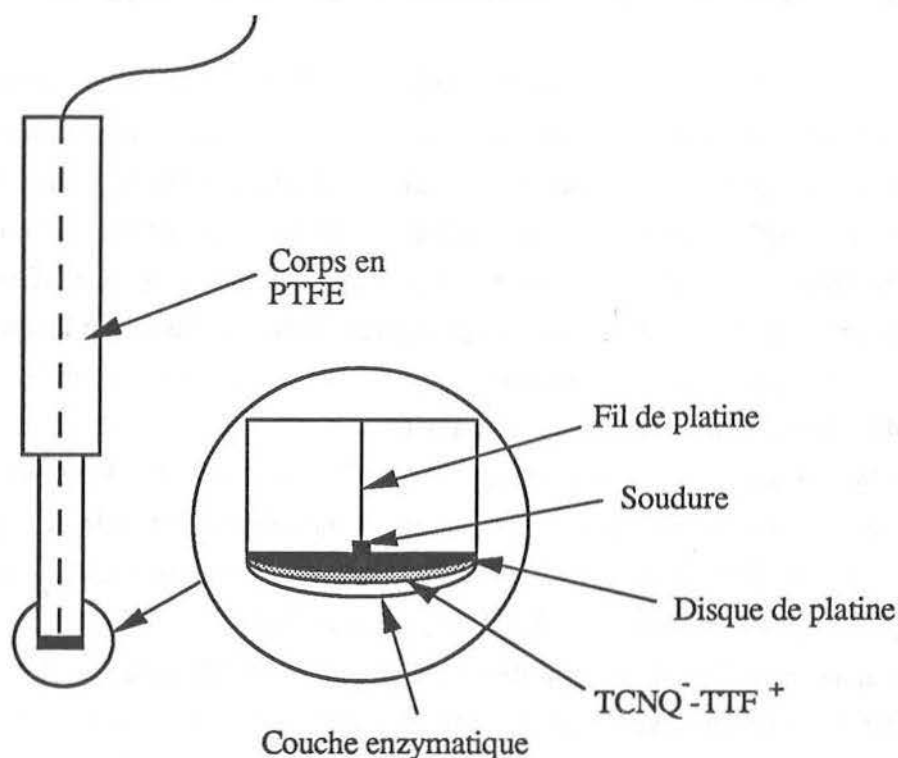


Figure 2.7 Biocapteur $\text{TCNQ}^- - \text{TTF}^+$ à AChE et COD immobilisées.

2.3.5.2 Biocapteur à membrane de polyamide pré-activée

Les membranes (PALL™) pré-activées en polyamide sont commercialement disponibles et nous sont fournies par Pall France avec une porosité de $3 \mu\text{m}$ et une épaisseur de $140 \mu\text{m}$. Des disques de 7 mm de diamètre sont découpés dans ces membranes pré-activées et sont ensuite séchés sous un flux d'azote. Deux méthodes d'immobilisation d'enzymes sont essentiellement utilisées et étudiées.

a. Immobilisation de l'enzyme par la méthode d'immersion de la membrane

Les disques de membrane découpés sont maintenus immergés (méthode de "membrane-immersion") pendant 2 heures, dans une solution contenant au moins 200 à 300 μg de protéine. ml^{-1} . Ensuite, ils sont rincés plusieurs fois avec un tampon phosphate de sodium de pH compris entre 7,0 et 7,4. Puis, les membranes sont séchées sous un flux d'azote pendant 2 heures avant d'être laissées une nuit dans une solution à 10 % (m/v) d'ASH, sous agitation, à 40°C, de façon à bloquer les sites de la membrane non-occupés par l'enzyme. Enfin, les membranes sont rincées dans le tampon, séchées sous un flux d'azote pendant 2 heures et stockées à 4°C, jusqu'à leur utilisation.

b. Immobilisation de l'enzyme par la méthode du mouillage par goutte

Pour la préparation des membranes à AChE, les disques sont placés, faces actives au-dessus, dans des béchers de 1 ml. Une goutte de 5 μl d'une solution enzymatique, soit 5 UI d'AChE dans du tampon phosphate de sodium 5 mM à pH 6,0, est déposée sur chaque disque (méthode de "spot-wetting"). Après un contact de 5 à 10 minutes, 5 μl d'une solution à 6 % (m/v) d'ASH dans du tampon phosphate sont ajoutés. Après 5 autres minutes, 5 μl d'une solution à 2,5 % (m/v) de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate sont introduits. Le temps de réaction est de 5 minutes. Les membranes sont ensuite rincées avec le tampon et séchées sous un flux d'azote pendant 45 minutes, avant d'être stockées à 4°C.

Pour la préparation des membranes PALL™ avec la BuChE et en vue de leur comparaison avec les revêtements de copolymère et les membranes en toile de Nylon™, nous avons adopté un procédé légèrement différent. Cette méthode est identique à celle utilisée par certains auteurs [58] pour l'immobilisation de l'AChE et de la COD.

Nous déposons 5 μl d'une solution de BuChE à 0,8 UI. μl^{-1} , soit 4 UI sur chaque disque, à température ambiante. Après un contact de 5 minutes, la membrane est enlevée, puis rincée dans une solution de chlorure de potassium 0,1 M, contenant 2% (m/v) d'ASH. Nous n'ajoutons pas alors de glutaraldéhyde.

La membrane est ensuite séchée sous azote et stockée à 4°C ou fixée sur l'électrode de pH en verre à l'aide d'un clip en PTFE, comme décrit sur la Figure 2.8.

Le tampon de travail utilisé pour les biocapteurs à AChE est un tampon phosphate de sodium 5 mM à pH 7,0, alors que pour les biocapteurs à BuChE, nous utilisons un tampon HEPES 2,5 mM à pH 7,6.

Lorsque les biocapteurs à membranes PALL™ ne sont pas utilisés, ils sont stockés dans le tampon de travail contenant en plus 0,01 % (m/v) d'azoture de sodium, pour éviter un développement microbien.

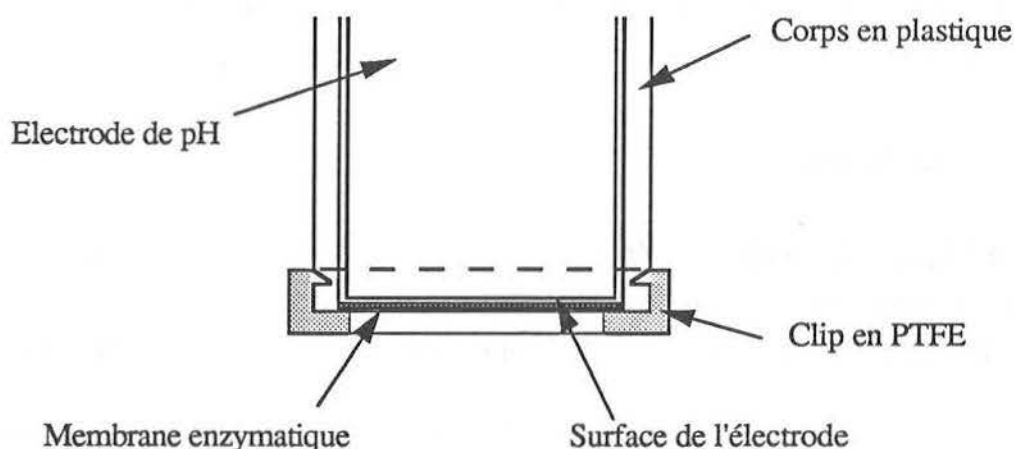


Figure 2.8 Fixation de la membrane enzymatique sur l'électrode de pH [59].

2.3.5.3 Biocapteur à revêtement en copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide

Pour les biocapteurs à AChE, une solution enzyme-copolymère est préparée en ajoutant les éléments suivants à 1 ml d'une solution aqueuse contenant 30 % (m/v) d'hydrazide du copolymère :

- 100 μ l d'une solution d'AChE à 1000 UI.ml⁻¹, dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,0, contenant 0,1 % (m/v) de gélatine,
- 65 μ l de tampon phosphate de sodium 2 M à pH 7,5,
- 10 μ l d'une solution à 1 % (m/v) de gélatine,
- 25 μ l d'eau.

Les concentrations finales de copolymère et d'AChE dans la solution enzyme-copolymère sont respectivement de 25 % (m/v) et d'environ 80 UI.ml⁻¹.

Le tampon de travail utilisé pour les biocapteurs à AChE à membrane en copolymère est le tampon HEPES 2,5 mM à pH 8,0, contenant 20 mM de MgCl₂, 100 mM de NaCl et 0,01 % (m/v) de gélatine.

Pour les biocapteurs à BuChE, la solution enzyme-copolymère est préparée par addition des éléments suivants à 940 μ l d'une solution aqueuse contenant 32 % (m/v) d'hydrazide du copolymère :

- 85 UI de BuChE solide,
- 50 μ l de tampon phosphate de sodium 2 M à pH 7,5,
- 100 μ l d'une solution à 1 % (m/v) de gélatine.

Les concentrations finales du copolymère et de l'AChE dans la solution enzyme-copolymère sont respectivement de 29,4 % (m/v) et d'environ 75 UI.ml⁻¹.

Le tampon de travail utilisé pour le biocapteur à BuChE à membrane en copolymère, est du tampon HEPES 2,5 mM à pH 7,6, contenant 20 mM de $MgCl_2$, 100 mM de NaCl et 0,01 % (m/v) de gélatine.

a. Electrodes en verre

La Figure 2.9 montre les étapes du procédé [15] de revêtement par immersion (méthode de "immersion-coating") de l'électrode de pH en verre avec la solution enzyme-copolymère. Si l'électrode n'est pas neuve, elle est d'abord nettoyée. Ceci se fait par trempages

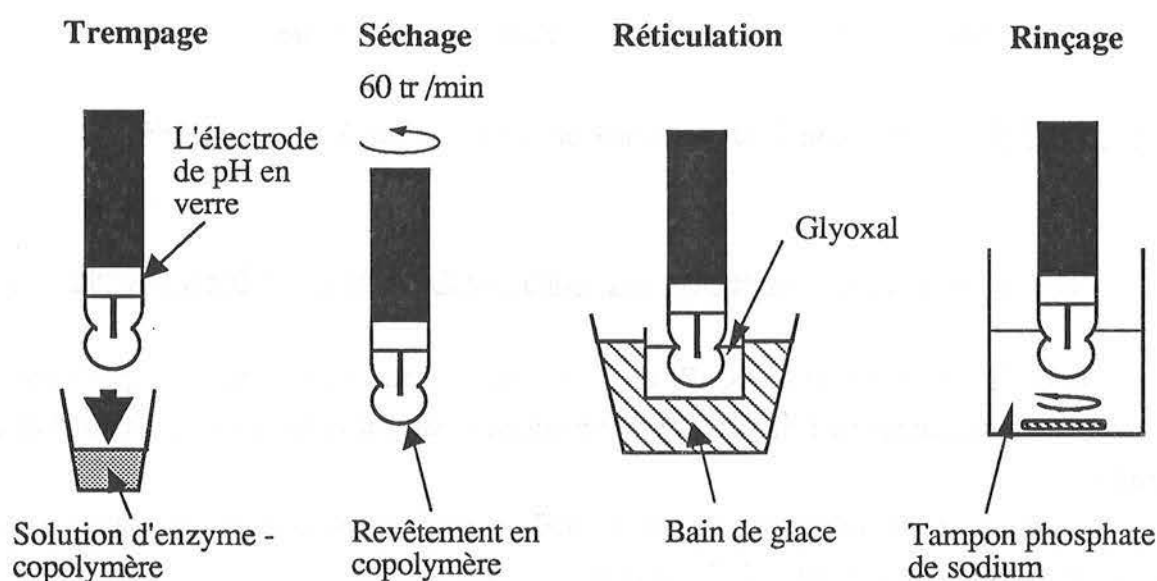


Figure 2.9 Revêtement de l'électrode de pH en copolymère contenant l'enzyme.

successifs dans de l'acide chlorhydrique 0,1 M, de l'eau distillée et de la soude 0,1 M, 3 fois de suite et pendant 15 minutes chaque fois. Puis, elle est laissée toute une nuit dans du tampon standard à pH 7,0. Ensuite, elle est rincée avec de l'eau et essuyée parfaitement avec du papier extra-fin avant d'être montée verticalement sur un axe rotatif. La membrane de verre de l'électrode est alors trempée dans la solution enzyme-copolymère pendant 1 minute à température ambiante. La solution de polymère est ensuite délicatement retirée laissant alors la surface de l'électrode recouverte par une fine couche de liquide. L'élimination de l'excès de liquide se fait par rotation de l'électrode à 60 tr/min, en position verticale. En effet, l'accumulation de liquide en excès forme des gouttelettes que l'on peut éliminer, délicatement, à l'aide d'une plaque de verre propre, lors d'arrêts intermittents de la rotation. Cette opération est répétée jusqu'à ce que l'excès de liquide ne soit plus visible au bout de l'électrode. On obtient ainsi un film d'enzyme presque uniforme et fortement adsorbé.

Puis, le film d'environ 50 μm d'épaisseur est séché par rotation à 60 tr/min de l'électrode en position verticale, pendant 1 heure à température ambiante. Le film blanc opaque obtenu est ensuite réticulé, en laissant tremper l'électrode, en position verticale, dans 5 ml d'une solution froide à 1 % (m/v) de glyoxal dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,0, pendant 1 heure sans agitation. L'électrode est alors immergée dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,0, sous agitation magnétique, pendant 10 minutes. Enfin, lorsqu'elle n'est pas utilisée, l'électrode est stockée à 4°C dans le tampon de travail contenant en plus 0,01 % (m/v) d'azoture de sodium.

b. Electrodes à Pd/PdO et Ir/IrO₂

Les électrodes à Pd/PdO et Ir/IrO₂ ont été étudiées par de nombreux auteurs, soit comme simples électrodes de pH [60-61], soit comme biocapteurs [37, 62-63].

Les fils métalliques de palladium (pureté = 99,99 %, ϕ = 1 mm) et d'iridium (pureté = 99,9 %, ϕ = 0,5 mm) sont fournis par Good Fellow Metal Advance Materials, en Angleterre. Des longueurs de 1,5 cm de ces fils métalliques sont coupées et oxydées selon le procédé ci-dessous, déjà décrit dans la littérature [64].

Les fils métalliques sont d'abord lavés avec de l'eau régale (HNO₃/HCl 1 : 4) et ensuite avec beaucoup d'eau. Ensuite, une de leurs extrémités est immergée sur une longueur d'environ 1 cm, dans une solution aqueuse de NaOH à 50 %, et séchée immédiatement sous azote pendant 30 minutes. Puis, les fils de palladium sont chauffés à $800 \pm 20^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes dans un four à oxygène, alors que les fils d'iridium sont chauffés à $600 \pm 20^\circ\text{C}$ dans le four à oxygène jusqu'à ce qu'une couche bleue-noire soit observée. Enfin, ces fils métalliques sont stockés dans de l'eau distillée à température ambiante, pendant 3 jours, avant d'être soudés aux fils conducteurs de platine. Avant la soudure, l'extrémité des fils métalliques non-recouverte avec de la soude est grattée pour éliminer la couche d'oxyde. Ils sont ensuite passés à travers un cône de plastique pour assurer l'isolement de l'extrémité inactive du fil métallique, à l'aide d'une résine époxy "scotchcast".

Les électrodes à fils métalliques sont d'abord testées par rapport à l'ECS avec des solutions standards de pH pour vérifier leur comportement Nernstien. Elles sont ensuite recouvertes avec la solution enzyme-copolymère suivant la méthode décrite pour les électrodes de pH en verre. La Figure 2.10 montre l'électrode à fil métallique recouverte d'enzyme.

Le tampon de travail utilisé pour les biocapteurs à AChE à Pd/PdO et Ir/IrO₂ à membrane en copolymère, est du tampon HEPES 5 mM à pH 8,0 contenant 20 mM de MgCl₂, 100 mM de NaCl et 0,01 % (m/v) de gélatine.

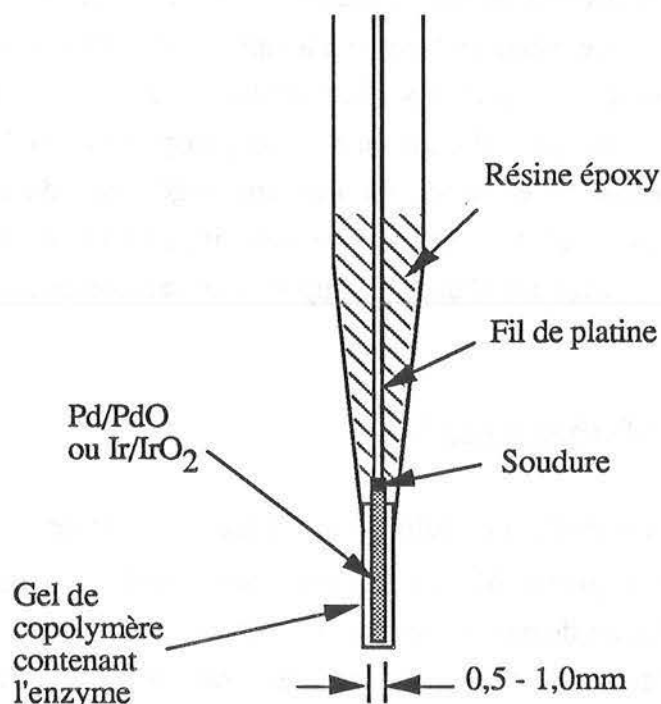


Figure 2.10 Biocapteur à Pd/PdO ou Ir/IrO₂ revêtu de l'enzyme.

Les électrodes non-utilisées, sont stockées à 4°C dans le tampon de travail contenant en plus 0,01 % (m/v) d'azoture de sodium.

2.3.5.4 Biocapteur à membrane en toile de Nylon™

La toile de Nylon™ (taille des pores: 150 µm) est fournie par PolyLabo Paul Block et Cie, France. Une pièce de toile de Nylon™ mesurant 5 cm x 4 cm est coupée et placée sur une plaque de PTFE parfaitement plane. Un mélange contenant :

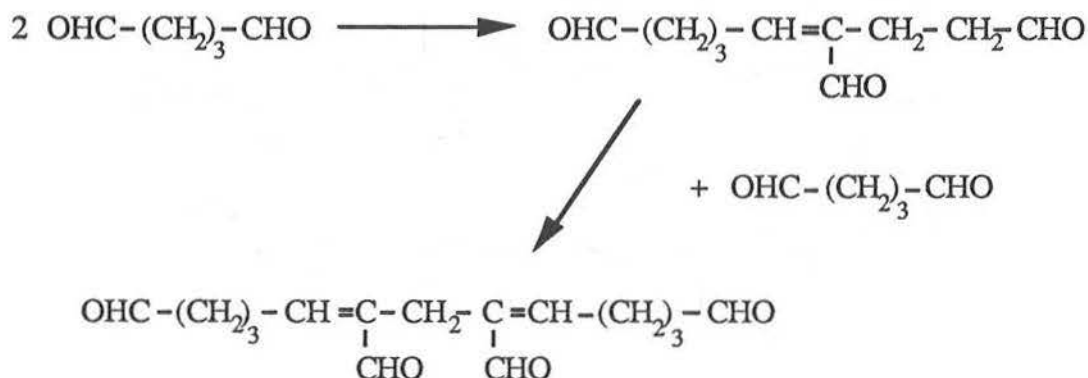
- 100 µl d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % (m/v) dans l'eau
- 200 µl d'une solution de BuChE à 1,1 UI.µl⁻¹ dans le tampon HEPES
- 200 µl d'une solution à 10 % (m/v) d'ASH dans l'eau

est déposé sur la toile et rapidement homogénéisé avec une spatule de verre. La quantité d'enzyme utilisée est telle que, chaque disque de 7 mm qui est ensuite découpé dans cette pièce de Nylon™, porte 4 UI. Une deuxième plaque de PTFE, identique à la première, est placée sur la toile et les deux plaques sont compressées en plaçant, par-dessus, un poids de 2 kg environ.

La réaction de réticulation entre les molécules d'enzyme, de glutaraldéhyde et d'ASH est réalisée pendant 30 minutes, à température ambiante. Le glutaraldéhyde est un agent réticulant utilisé très fréquemment. Il se trouve essentiellement sous forme polymérisée et contient des

quantités importantes d'aldéhydes α,β insaturés résultant de la perte d'eau par condensation aldolique. Le schéma réactionnel proposé pour l'aldolisation et pour la réticulation avec les molécules d'enzyme [65], est illustré dans la Figure 2.11. L'ASH se comporte comme une protéine inerte fournissant les groupements amines nécessaires pour la réaction de réticulation.

Aldolisation:



Réactions de réticulation:

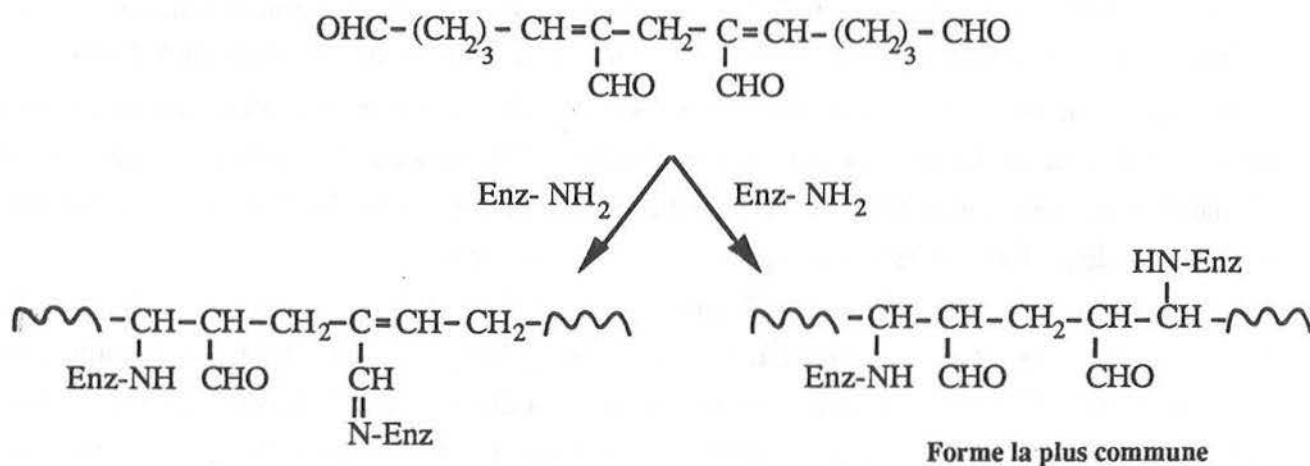


Figure 2.11 Réactions d'aldolisation et de réticulation avec le glutaraldéhyde.

La toile est ensuite délicatement enlevée, rincée avec du tampon de travail puis séchée sous un flux d'azote. La membrane enzymatique sèche est découpée en disques de 7 mm de diamètre et stockée à 4°C ou fixée sur l'électrode de pH en verre à l'aide d'un clip de PTFE comme illustré dans la Figure 2.8.

Le tampon de travail utilisé pour les biocapteurs à BuChE en toile de Nylon™, est du tampon HEPES 2,5 mM à pH 7,6, contenant 20 mM de MgCl₂, 100 mM de NaCl et 0,01% (m/v) de gélatine.

2.3.5.5 Biocapteur à uréase à nonactine

Les propriétés de l'antibiotique nonactine (Figure 2.12) comme agent complexant [66] et son utilisation dans la construction d'électrodes sélectives à ammonium pour l'analyse de l'urée, ont été largement étudiées [13, 67-68].

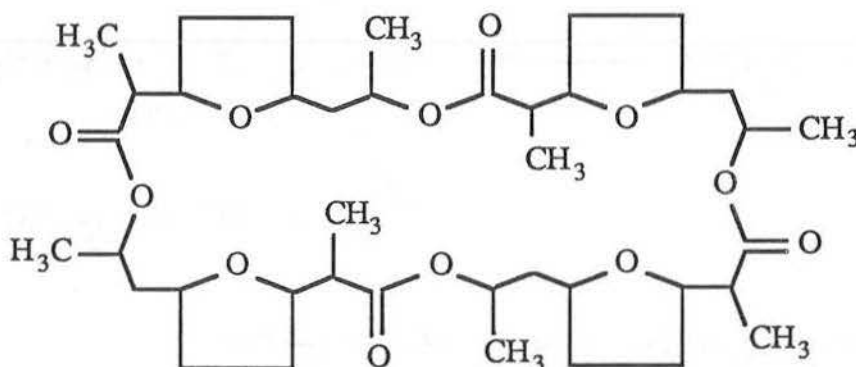


Figure 2.12 Structure de la molécule de nonactine.

Pour la construction des électrodes sélectives à ammonium à nonactine présentées dans notre étude [69], des quantités égales de résine époxy et de poudre de graphite sont intimement mélangées et placées dans un tube de PVC ($\phi_{\text{int}} = 4$ mm) contenant un disque de platine de même diamètre. La longueur de colonne chargée en époxy-graphite est d'environ 5 à 6 mm au-dessous du disque de platine. La colonne est ensuite séchée à 95°C pendant 12 heures. L'autre face du disque de platine est connectée à un fil de platine à l'aide d'une résine chargée en argent. Un trou de 0,25 mm de profondeur est ensuite percé dans la résine sèche.

Une solution de PVC à 4 % (m/v) dans du THF anhydre contenant 1 % (m/v) de nonactine et 15 % (m/v) de phosphate de tris (2-éthylhexyl) est préparée, en prenant soin d'observer que le PVC et la nonactine soient entièrement dissous dans le solvant. La solution est versée de façon à remplir complètement le trou dans la résine époxy chargée en graphite. L'électrode est ensuite laissée une nuit au sec, à température ambiante, avant de procéder au revêtement de l'extrémité de l'électrode par la solution enzyme-copolymère comme décrit dans le § 2.3.5.3 (a).

La Figure 2.13 montre l'électrode à uréase à nonactine. Lorsque l'électrode n'est pas utilisée, elle est stockée à 4°C dans le tampon de travail contenant en plus 0,01 % (m/v) d'azoture de sodium.

Le tampon de travail utilisé pour les biocapteurs à uréase à nonactine est un tampon tris-HCl 0,1 M à pH 7,4.

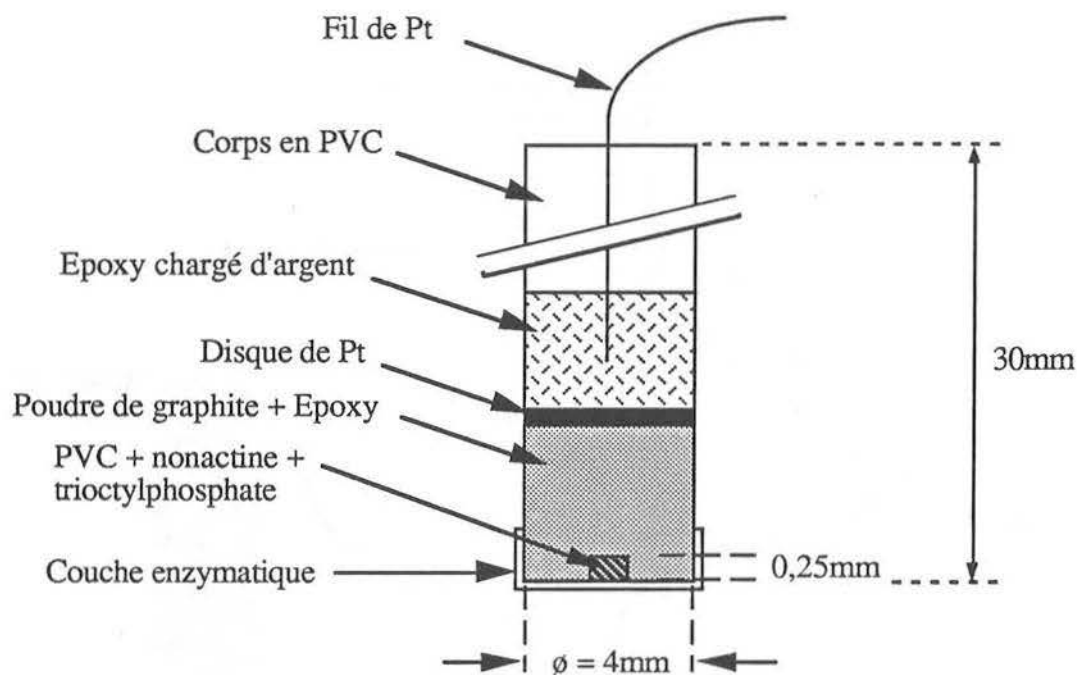


Figure 2.13 Electrode sélective à ammonium à nonactine revêtue par l'uréase.

2.3.5.6 Biocapteur à glutaraldéhyde vaporisé

Au préalable, les électrodes de verre sont nettoyées. Elles sont d'abord rincées dans l'acétone et lavées parfaitement avec de l'eau. Elles sont ensuite nettoyées comme mentionné dans le § 2.3.5.3 (a).

L'extrémité sensible de l'électrode est d'abord immergée dans une solution enzymatique (contenant plus de $1000 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine) préparée dans le tampon de travail, à température ambiante, pendant 20 minutes, avant d'être séchée à 4°C pendant 20 minutes. L'électrode est ensuite montée sur un axe horizontal qui est mis en rotation à 50 tr/min (Figure 2.14). Une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % (m/v) dans l'eau est finement vaporisée sur l'extrémité sensible de l'électrode à température ambiante. La vaporisation est réalisée au moyen d'un vaporisateur à azote sous une pression de 1,5 bar.

Le vaporisateur doit être tenu à une distance suffisante de l'électrode pour que les gouttelettes ne coalescent pas sur l'extrémité de l'électrode et forment un système de réticulation très dense avec l'enzyme. Pour les mêmes raisons, la durée de la vaporisation doit être limitée à environ 3 secondes. Pour éviter l'inhalation de vapeurs de glutaraldéhyde durant la vaporisation, des masques de protection sont portés et la manipulation est effectuée sous une hotte aspirante. Après vaporisation, l'électrode est de nouveau laissée à 4°C pendant 15 à 20 minutes, avant d'être rincée dans du tampon à température ambiante, pendant 5 minutes. Jusqu'à leur utilisation, les électrodes sont stockées à 4°C dans les tampons de travail contenant en plus 0,01 % (m/v) d'azoture de sodium.

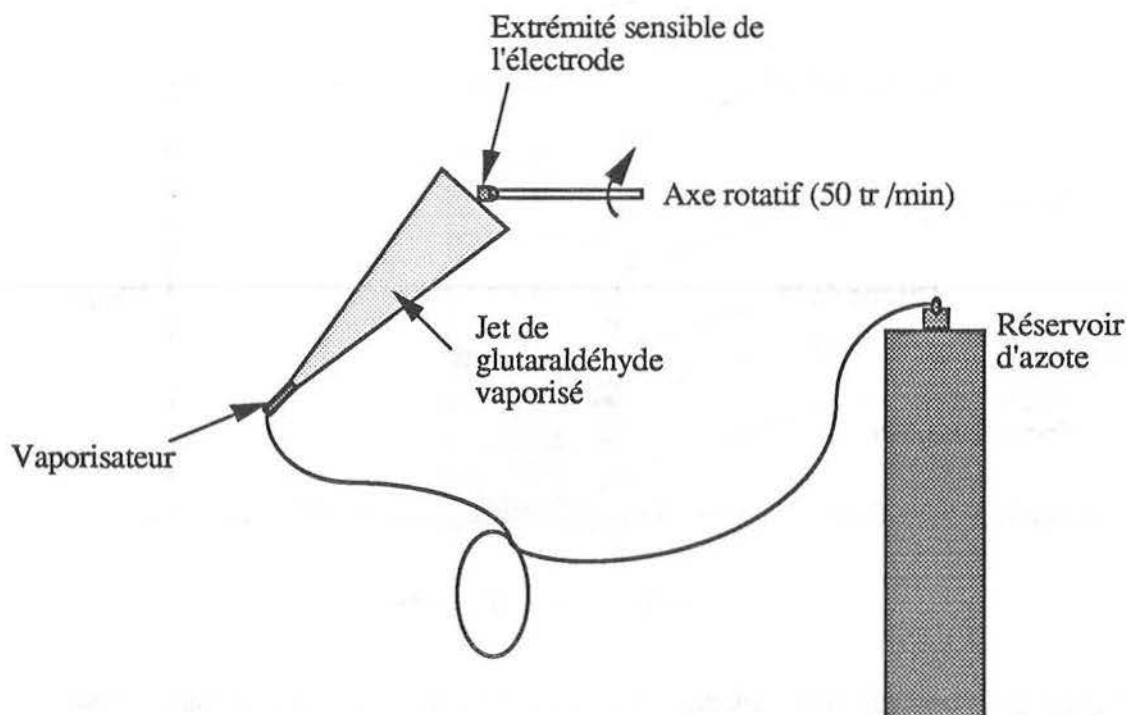


Figure 2.14 Montage utilisé pour la vaporisation du glutaraldéhyde sur l'électrode.

Les tampons de travail utilisés pour les biocapteurs à glutaraldéhyde vaporisé sont :

- Tampon HEPES 2,5 mM à pH 7,3, contenant 20 mM de $MgCl_2$, 100 mM de NaCl et 0,01 % (m/v) de gélatine, pour l'AChE, la BuChE et la pénicillinase.
- Tampon tris-acétate 10 mM à pH 7,0, pour l'uréase.

2.3.6 MESURES AMPEROMETRIQUES

2.3.6.1 Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique des électrodes modifiées à $TCNQ^-TTF^+$ (avec et sans enzyme immobilisée) est effectuée par utilisation d'un montage à 3 électrodes comme indiqué dans la Figure 2.15.

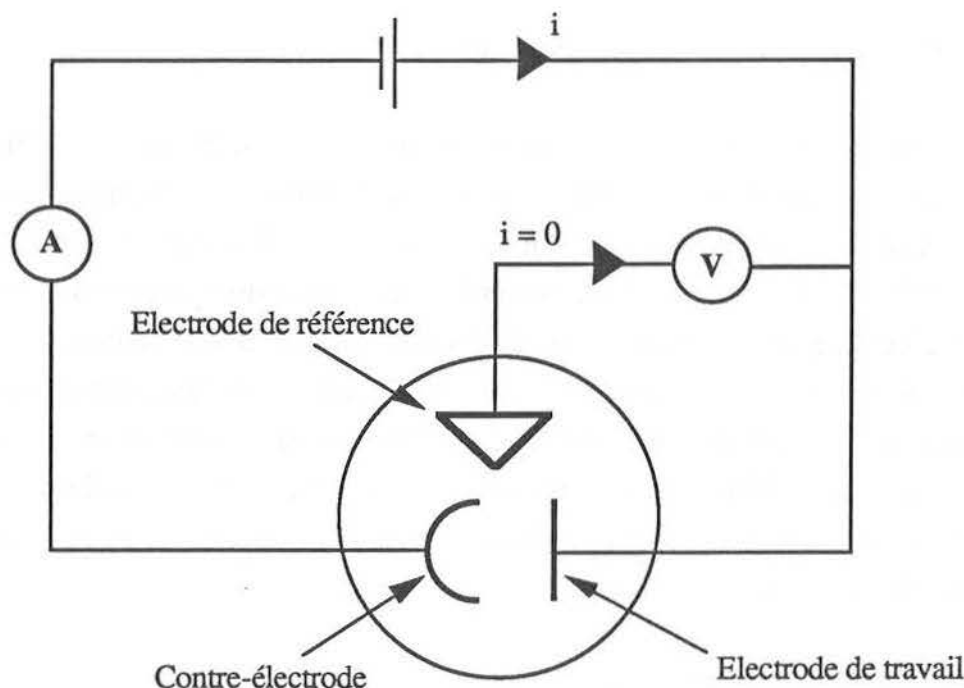


Figure 2.15 Montage à 3 électrodes pour les mesures ampérométriques.

En traçant les voltampérogrammes, il est possible d'examiner les potentiels auxquels les courants cathodique ou anodique correspondants, dus au phénomène rédox, surviennent. C'est aussi un moyen de vérifier les qualités des électrodes à sels organiques conducteurs.

Les électrodes sont placées dans une cellule thermostatée maintenue à 30°C au moyen d'un thermostat (Ultra thermostat K5, Colora messtechnik GmbH Lorch/Württ, Allemagne). Les conditions opératoires sont choisies de telle sorte que la force ionique du tampon, la concentration de l'électrolyte, le pH et la température, soient tous dans les limites de celles trouvées dans la littérature [57, 70] pour les électrodes à TCNQ⁻-TTF⁺.

10 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,2, contenant 0,1 M de perchlorate de potassium, sont utilisés comme tampon de travail.

Le potentiel de l'électrode de travail par rapport à l'ECS, est balayé entre les limites de voltage fixées au moyen du potentiostat. Quand le potentiel est balayé au-delà du domaine d'électroactivité, soit dans le sens négatif, soit dans le sens positif, une réaction de transfert de charge survient, provoquée par la réduction ou l'oxydation à la surface de l'électrode. Le comportement dépend de la nature de l'électrolyte et des solubilités des sels formés par les ions de TCNQ et de TTF, avec les ions de l'électrolyte [57]. Le courant catalytique résultant entre l'électrode de travail et la contre-électrode est représenté en fonction du potentiel appliqué, à l'aide d'un traceur. Avant chaque expérience, la solution est dégazée avec de l'azote présaturé avec de l'eau. Durant les expérimentations, un flux d'azote est maintenu sur la solution.

2.3.6.2 Mesure de courants stationnaires

L'électrode TCNQ⁻-TTF⁺ revêtue d'enzyme, la contre-électrode et l'électrode de référence, sont placées dans une cellule thermostatée avec 10 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,2, contenant 0,1 M de perchlorate de potassium. On applique au biocapteur un potentiel de + 350 mV par rapport à l'ECS. Après la chute rapide du courant résiduel jusqu'à un état stationnaire, les différentes concentrations d'ACh sont ajoutées dans la cellule. Le mélange est agité pendant 2 secondes et le courant stationnaire noté après environ 10 secondes. Pour l'analyse de la nicotine, après addition de 1,5 mM d'ACh et obtention du courant en phase stationnaire, 100 µl d'une solution de l'inhibiteur à différentes concentrations sont introduits dans la cellule. La chute du courant stationnaire à une valeur plus faible est utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition de l'AChE, suivant l'expression :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100$$

où, I_0 est le courant stationnaire obtenu avant l'addition de nicotine,
 I_1 est le courant stationnaire obtenu après l'addition de nicotine.

2.3.7 MESURES POTENTIOMETRIQUES

Les mesures potentiométriques sont conduites en cellule sous agitation magnétique et thermostatée à 25°C. Un schéma du montage expérimental est représenté sur la Figure 2.16.

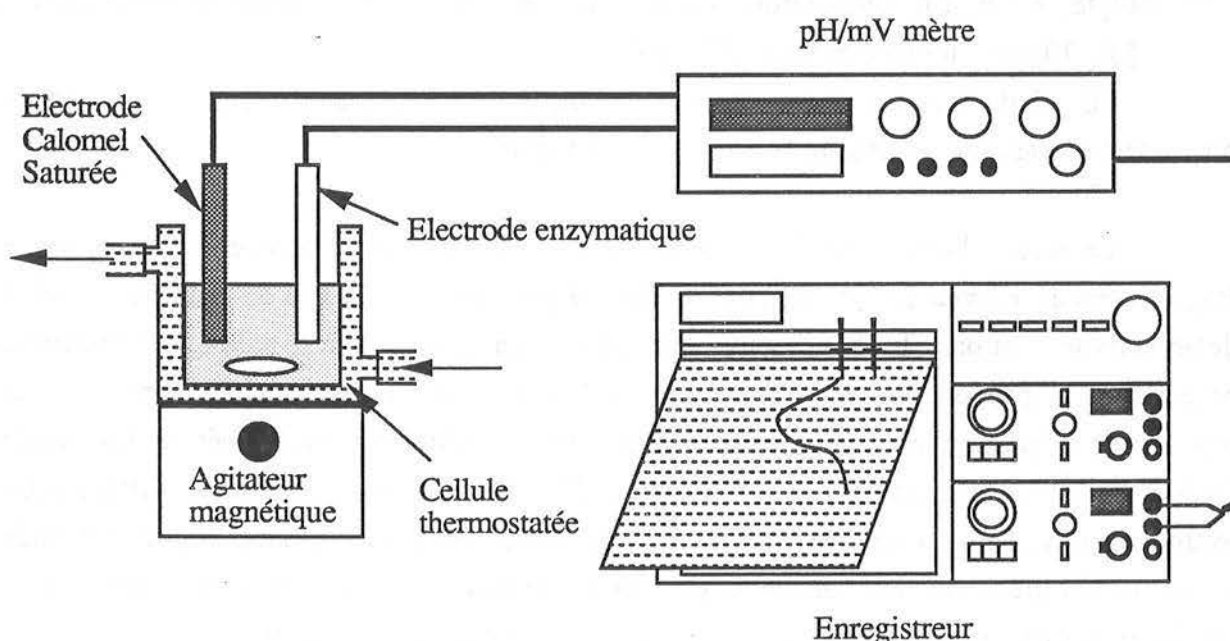


Figure 2.16 Schéma du montage utilisé pour les mesures potentiométriques.

Un volume déterminé de tampon de travail est d'abord ajouté dans la cellule. Lorsqu'une ligne de base stationnaire est obtenue, le substrat est alors ajouté dans la cellule et la réponse du capteur enregistrée.

Pour le dosage d'inhibiteur en présence du substrat, l'inhibiteur est ajouté dans la cellule après l'obtention d'un signal de réponse stationnaire par le biocapteur. La perte de signal du biocapteur (lecture en pH ou en mV) due à l'inhibition enzymatique est observée après une période de temps fixe et le pourcentage d'inhibition de l'enzyme est calculé comme montré dans la Figure 2.17.

Lorsque l'inhibition de l'enzyme est effectuée en l'absence du substrat, le biocapteur est laissé en incubation avec l'inhibiteur ajouté au tampon de travail, pendant une période de temps fixée. Le capteur est ensuite enlevé et placé dans du tampon neuf auquel le substrat est ajouté. La réponse diminuée est enregistrée et le pourcentage d'inhibition calculé comme décrit dans la Figure 2.18.

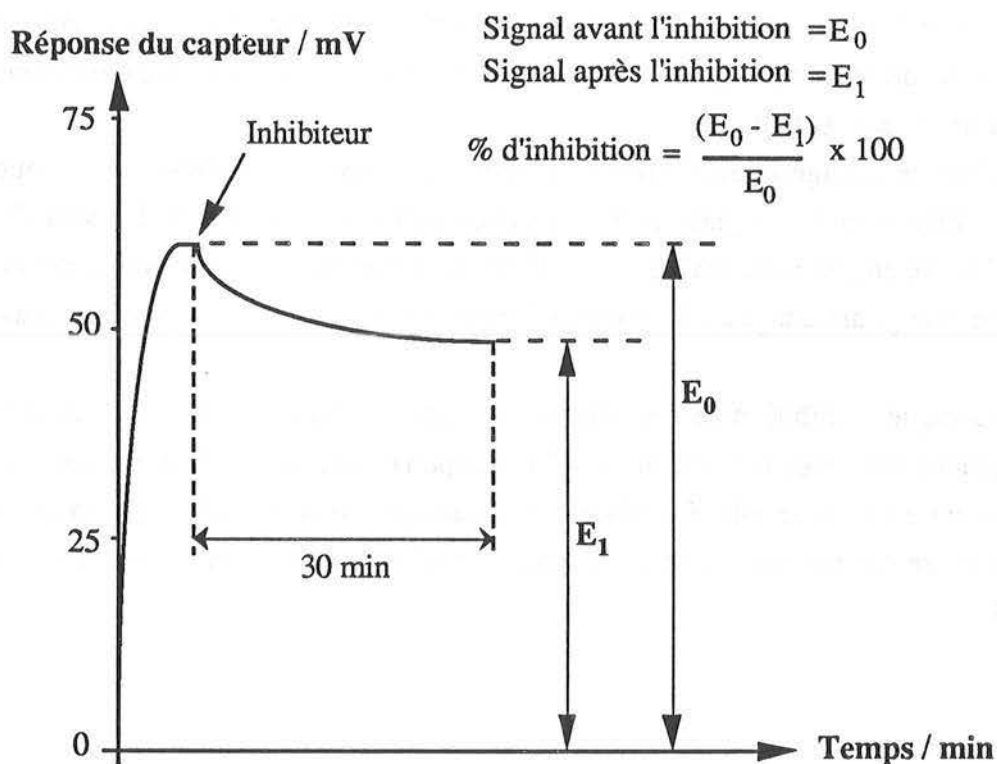


Figure 2.17 Dosage direct de l'inhibiteur en suivant la réponse du biocapteur en présence du substrat, avant et après addition de l'inhibiteur.

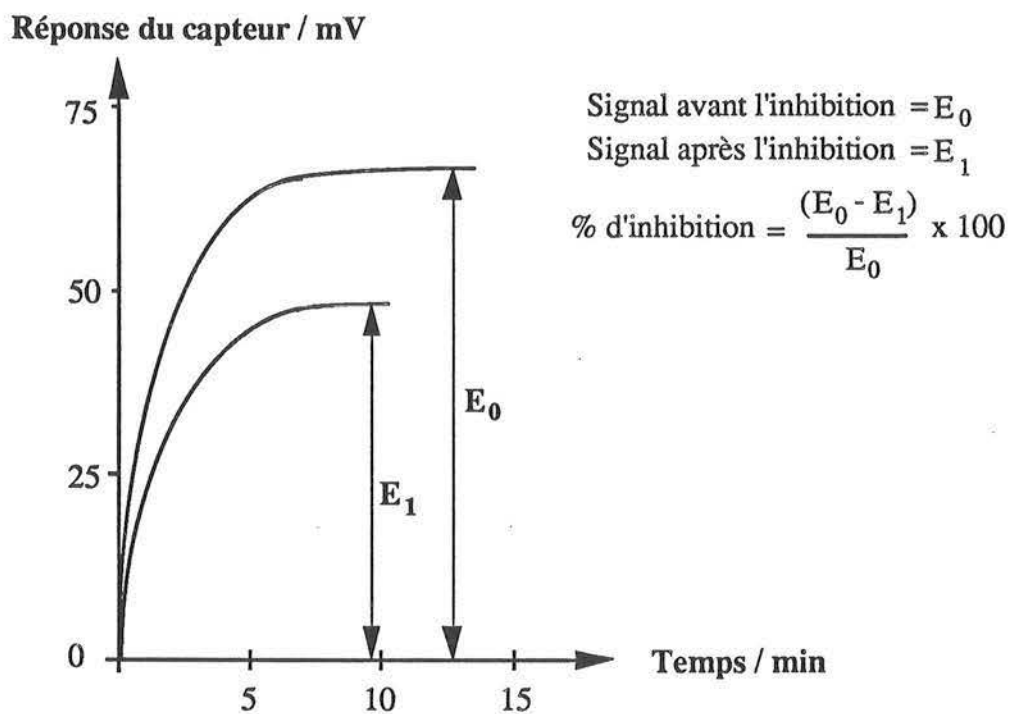


Figure 2.18 Dosage indirect de l'inhibiteur (avec incubation préalable entre l'enzyme et l'inhibiteur effectuée en l'absence du substrat).

CHAPITRE 3

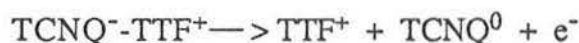
RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 BIOCAPTEURS DE TYPE AMPEROMETRIQUE

3.1.1 BIOCAPTEUR TCNQ⁻-TTF⁺ A ACHE ET COD IMMOBILISEES

3.1.1.1 Electrochimie de l'électrode TCNQ⁻-TTF⁺

Quand l'électrode TCNQ⁻-TTF⁺ est soumise à des potentiels plus positifs que le domaine d'électroactivité, le TCNQ⁻ est oxydé en TCNQ⁰ neutre comme montré ci-dessous :



En solution aqueuse, le TCNQ⁰ est insoluble et reste à la surface de l'électrode. L'évolution du TTF⁺ dépend de la composition de la solution électrolytique. Il peut soit se dissoudre, soit former un dépôt insoluble avec les anions présents dans la solution. Dans les électrolytes contenant de l'acétate, le TTF⁺ est soluble tandis que dans le bromure et à un degré moindre dans les solutions de chlorure, les sels de TTF sont insolubles et se déposent sur les électrodes [55]. Ces espèces insolubles se trouvant à la surface sont électroactives et se manifestent dans la voltampérométrie cyclique.

Si l'électrode est soumise à des potentiels plus négatifs que le domaine d'électroactivité, le TCNQ⁻-TTF⁺ est réduit en TTF⁰ et TCNQ⁻.



Dans ce cas aussi, l'évolution du TCNQ⁻ dépend de la composition de la solution électrolytique. Dans les solutions de lithium, le TCNQ⁻ est soluble, mais en présence de sodium ou de potassium, un sel de TCNQ insoluble se dépose [55]. A nouveau, ces dépôts insolubles sont électroactifs à la surface de l'électrode.

3.1.1.2 Voltampérométrie cyclique

La Figure 3.1 montre le voltampérogramme cyclique obtenu pour l'électrode TCNQ⁻-TTF⁺ (sans enzyme), dans les conditions opératoires mentionnées en légende. Lorsque le potentiel balayé varie de + 520 mV à - 255 mV par rapport à l'ECS, on observe l'apparition d'un pic anodique à + 275 mV et d'un pic cathodique à - 85 mV.

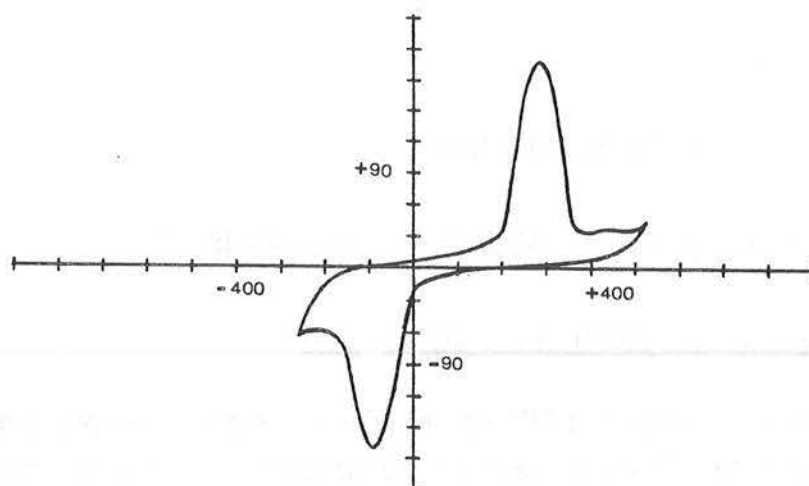


Figure 3.1 Voltampérogramme cyclique d'une électrode à TCNQ⁻-TTF⁺ sans enzyme.

Conditions opératoires :

Vitesse de balayage : 10 mV.s⁻¹

Tampon : Phosph. de sodium, 0,1 M, pH = 8,2.

Electrolyte : Perchlorate de potassium, 0,1 M.

Température : 30°C

Echelle: abscisse : 1 div. = 100 mV,
ordonnée: 1 div. = 30 μ A

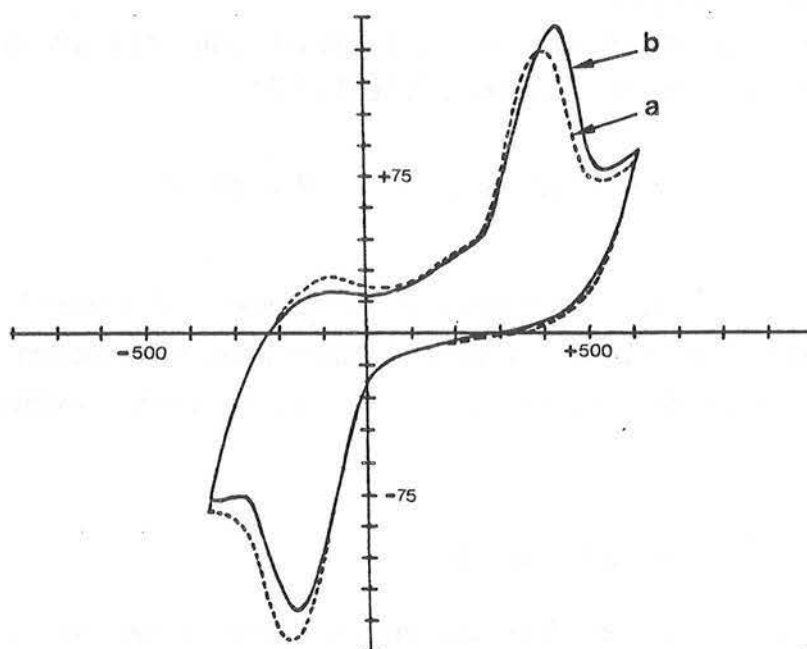


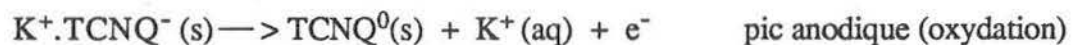
Figure 3.2 Voltampérogramme cyclique du biocapteur TCNQ⁻-TTF⁺ / AChE / COD en absence (a) et en présence (b) de 1,5 mM d'ACh.

Vitesse de balayage : 25 mV.s⁻¹

Echelle : abscisse 1 div. = 100 mV, ordonnée 1 div. = 15 μ A

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.1.

Ces pics correspondent aux procédés d'oxydation et de réduction de TCNQ, en présence d'ions potassium provenant de l'addition de perchlorate de potassium utilisé comme électrolyte. Ils sont expliqués par les équations suivantes :



Pour une électrode TCNQ⁻-TTF⁺ utilisant l'acétate de potassium comme électrolyte, le potentiel rédox pour le couple TCNQ/TCNQ⁻, était noté à + 290 mV et + 40 mV par rapport à l'ECS, pour les procédés anodiques et cathodiques, respectivement [57].

3.1.1.3 Choix du potentiel de travail

La courbe (a) de la Figure 3.2 indique la modification du voltampérogramme cyclique survenue quand l'électrode TCNQ⁻-TTF⁺ est revêtue simultanément avec les enzymes AChE et COD. Le pic à l'anode est situé à un potentiel plus haut, + 400 mV, par rapport à l'ECS. La courbe (b) montre le cycle voltampérométrique pour une concentration d'ACh de 1,5 mM dans la cellule de travail. Des expérimentations ultérieures sont conduites à un potentiel fixé à + 350 mV par rapport à l'ECS, là où le courant catalytique commence à augmenter.

3.1.1.4 Dosage de l'ACh

L'accroissement du courant catalytique à l'anode avec les différentes concentrations d'ACh, dans une solution désoxygénée, est enregistré et un étalonnage effectué, comme indiqué dans la Figure 3.3. On peut observer que la gamme analytique utile du capteur TCNQ⁻-TTF⁺-AChE-COD pour le dosage de l'ACh est située entre 0,5 et 5 mM. La concentration du substrat choisie pour déterminer l'activité enzymatique dans les tests d'inhibition avec la nicotine est de 3 mM.

3.1.1.5 Dosage de la nicotine

La nicotine, un inhibiteur réversible de l'AChE très bien connu [35], est déterminée après étalonnage de l'électrode. Ceci se fait par enregistrement de la décroissance du courant à l'état stationnaire chaque fois qu'une quantité prédéterminée de nicotine est ajoutée. La Figure 3.4 montre une courbe d'étalonnage de la nicotine où la décroissance du signal par rapport au signal témoin sans inhibiteur est présentée comme un pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration nicotinique.

La limite de détection de la nicotine avec ce capteur est de 0,02 mM. L'inhibition complète de l'enzyme nécessite 0,5 mM de nicotine. Cependant, des limites de détection plus

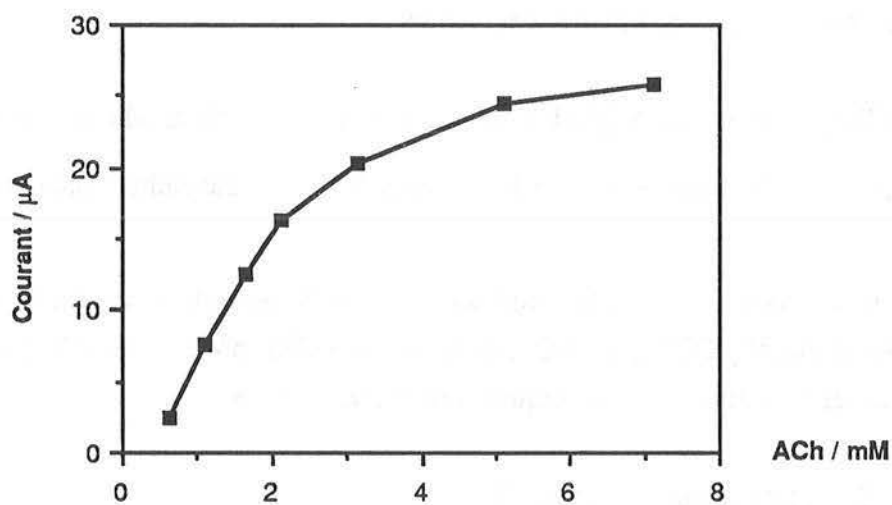


Figure 3.3 Courbe d'étalonnage de l'ACh avec le biocapteur à TCNQ⁻-TTF⁺/AChE/COD.

Conditions opératoires : Tampon : Phosph.de sodium, 0,1 M, pH = 8,2.
Electrolyte : Perchlorate de potassium, 0,1 M.
Température : 30°C.
Volume de travail : 10 ml.

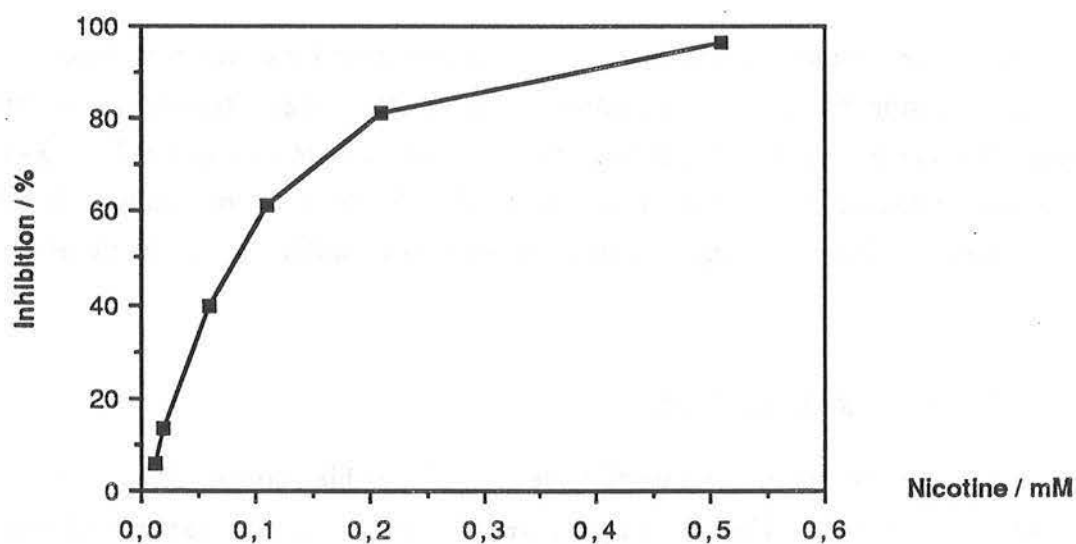


Figure 3.4 Courbe d'étalonnage pour le dosage de la nicotine.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.3.

basses de la nicotine ont été obtenues par l'inhibition de l'AChE en utilisant des électrodes potentiométriques [37]. Comme la nicotine est un inhibiteur réversible de l'AChE, un simple rinçage de l'électrode dans une solution contenant le tampon de travail et l'ACh, restaure l'activité de l'enzyme.

3.1.1.6 Stabilité

Lorsqu'elles ne sont pas utilisées, les électrodes sont stockées dans le tampon de travail à 4°C. Cependant, la durée de vie du biocapteur TCNQ⁻-TTF⁺/AChE/COD peut varier de quelques heures à plusieurs jours. Ceci, apparemment, est l'un des plus gros inconvénients des électrodes modifiées avec des sels organiques conducteurs. Par exemple, certains auteurs [71] ont même mentionné que la durée de vie des électrodes revêtues par l'intermédiaire d'un dépôt de goutte de TCNQ et préparées avec la glucose oxydase pour l'analyse du glucose, pouvait être inférieure à 1 heure 30 .

Conclusions

- La recherche sur les biocapteurs ampérométriques chimiquement modifiés a été primitivement orientée vers la réduction du potentiel opératoire de l'électrode de travail de telle sorte que ce potentiel minimise les interférences dues à la présence d'autres substances électro-actives. Etant donné le succès relatif rencontré dans l'analyse du glucose, du lactate, etc., dans des échantillons réels, peu de publications ont été faites sur l'utilisation des biocapteurs ampérométriques chimiquement modifiés pour l'analyse de composés toxiques tels que les anticholinestérases.

- L'électrode TCNQ⁻-TTF⁺ modifiée avec de l'AChE et de la COD immobilisées, permet le dosage de l'ACh dans la gamme de 0,5 à 5 mM.

- Ce biocapteur peut être utilisé pour le dosage de la nicotine par inhibition de l'AChE. La limite de détection de la nicotine est de 0,02 mM (pour 5 % d'inhibition) ; l'enzyme est inhibée à 100 % à la concentration de 0,5 mM.

- Il est possible que l'utilisation d'un système bi-enzymatique rende complexe l'environnement du capteur car il pourrait également se produire une inhibition simultanée de l'enzyme rédox.

- L'expérience a montré que des électrodes potentiométriques (par exemple : des électrodes de pH) sont très performantes avec les cholinestérases pour le dosage des anticholinestérases. Les avantages, dans ce cas, sont la meilleure reproductibilité des réponses du capteur, l'utilisation d'une seule enzyme, et une durée de vie du capteur plus grande.

- Par conséquent, le travail présenté ensuite sur le développement des biocapteurs pour le dosage des composés toxiques, sera basé sur les capteurs potentiométriques.

3.2 BIOCAPTEURS DE TYPE POTENTIOMETRIQUE

3.2.1 BIOCAPTEUR A MEMBRANE EN POLYAMIDE PRE-ACTIVEE CHARGEE DE L'ACHE

3.2.1.1 Préparation des membranes enzymatiques

Les fabricants de ces membranes préactivées (PALL™) fournissent une brève description de la manière dont s'effectue le transfert des protéines, mais ils recommandent aussi l'étude et l'optimisation de ce procédé par l'utilisateur lui-même. Primitivement, nous avons immobilisé l'enzyme par immersion de la membrane (méthode de "membrane-immersion"), telle qu'elle est décrite au § 2.3.5.2 (a).

3.2.1.2 Facteurs influençant l'immobilisation enzymatique

De façon à améliorer la durée de vie des membranes et pour simplifier globalement la procédure d'immobilisation, quelques paramètres influençant l'immobilisation ont été étudiés individuellement, puis optimisés. Les paramètres étudiés et les résultats obtenus sont discutés dans les paragraphes suivants.

a. Quantité d'enzyme

D'abord, nous avons suivi le procédé d'immersion de membranes pour étudier l'effet de paramètres variés sur la fixation de l'enzyme. Une activité enzymatique assez élevée permet d'obtenir des signaux mesurables, cependant la charge de l'enzyme est un facteur important dans le dosage des inhibiteurs. En effet, il est nécessaire de charger la membrane avec une quantité minimum d'enzyme pour obtenir des limites de détection en inhibiteur faibles [72]. Dans le procédé d'immersion de la membrane, il est conseillé d'immerger la membrane dans une solution contenant 200-300 μg de protéine. ml^{-1} . Cela implique l'utilisation d'une solution enzymatique contenant environ 230-340 $\text{UI}.\text{ml}^{-1}$ (activité spécifique de l'AcChE : 1140 $\text{UI}.\text{mg}^{-1}$ de protéine). Une telle concentration d'enzyme est inconcevable pour la détection d'inhibiteur. Nous avons testé l'effet d'enzyme de concentrations dix à vingt fois plus faibles. Les résultats sont montrés sur la Figure 3.5.

Il apparaît clairement qu'une concentration d'enzyme plus élevée dans la solution de contact, améliore l'activité enzymatique. Une solution enzymatique de 20 ml est utilisée dans chaque cas pour un total de 10 membranes immergées. Dans les tests suivants, nous limiterons la concentration de cette solution à 25 $\text{UI}.\text{ml}^{-1}$.

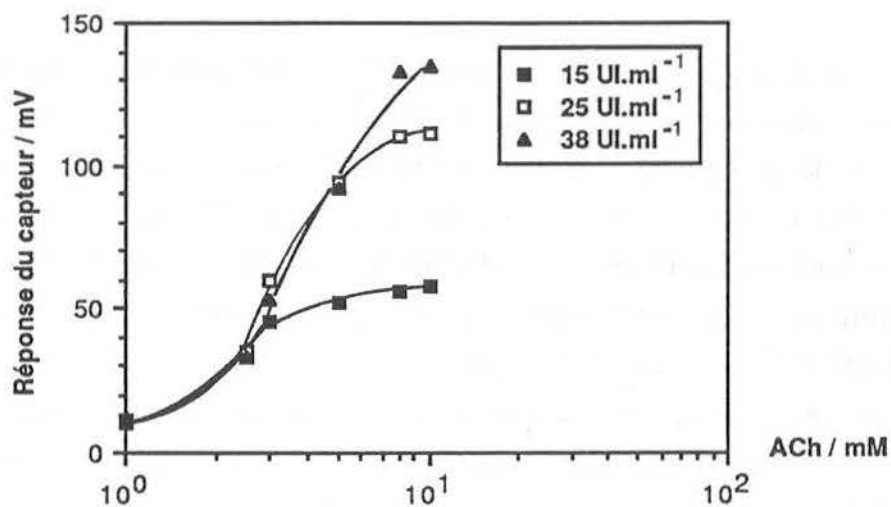


Figure 3.5 Réponse du capteur à l'ACh à partir de membranes préparées par immersion dans des solutions d'enzyme à différentes concentrations (pH de la solution enzymatique = 6,0 ; solution d'ASH : 10 % (m/v)).

Conditions opératoires : Tampon phosphate de sodium 5 mM à pH 7,0.
Volume de travail : 20 ml.
Température : 25°C.

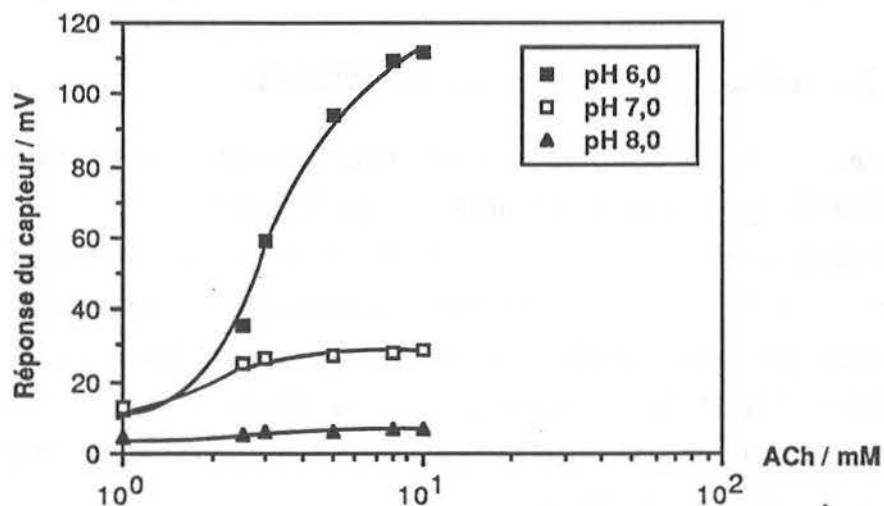


Figure 3.6 Réponse du capteur à l'ACh à partir de membranes préparées par immersion dans des solutions d'enzyme de 25 UI.ml⁻¹, à pH d'immobilisation différent.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.5.

b. pH

Même si la nature des groupes actifs présents sur la membrane reste confidentielle, les fabricants de membranes indiquent que les réactions se produisent avec les groupements amines à des pH alcalins, suivis par les groupements carboxyles à pH acide et les groupements hydroxyles à pH neutre. L'immobilisation est effectuée à des valeurs de pH de 6,0, 7,0 et 8,0 de façon à observer le comportement de ces membranes avec l'électrode. La Figure 3.6 montre la réponse de l'électrode lors de l'utilisation de membranes préparées par immersion dans une solution enzymatique de 25 UI.ml⁻¹ à différentes valeurs de pH.

La meilleure courbe de réponse est obtenue lorsque l'enzyme est immobilisée à un pH de 6,0. Ceci indique que l'attachement de l'enzyme par l'intermédiaire de groupements carboxyles aux groupements actifs de la membrane, permet l'obtention d'une activité enzymatique maximale. Les préparations des membranes ultérieures seront donc faites à ce pH.

c. Traitement avec l'ASH

Les membranes sont préparées avec et sans traitement par ASH, pour vérifier si cette étape est indispensable. Les courbes de réponse mentionnées sur la Figure 3.7 montrent que le blocage par l'ASH des sites de la membrane non-occupés par l'enzyme, n'ajoute aucune performance aux réponses des capteurs. Les préparations membranaires ultérieures seront donc faites sans cette étape.

d. Temps de contact entre l'enzyme et la membrane

Le temps de contact entre l'enzyme et la membrane est ensuite étudié pour déterminer s'il est essentiel de maintenir un temps de contact aussi long que 2 heures.

Une expérience simple est donc faite pour déterminer le nombre résiduel d'unités enzymatiques présentes dans la solution de contact. Une membrane de diamètre 7 mm est immergée et laissée sous agitation constante dans une solution de 2 ml contenant initialement 50 UI. A des intervalles de temps de 5-10 minutes, 5 µl de cette solution de contact sont prélevés et testés pour déterminer leur activité. La Figure 3.8 montre la diminution des unités enzymatiques dans la solution de contact en fonction du temps.

Deux résultats importants peuvent être interprétés à partir de cette figure. D'abord, la fixation de l'enzyme sur la membrane peut être effectuée complètement en 10 minutes de contact. Ensuite, il y a une activité résiduelle de 28 UI dans la solution, ce qui indique qu'il est nécessaire de diminuer le volume de la solution de contact pour éviter la perte d'enzyme. La meilleure solution est donc d'immobiliser l'enzyme par dépôt de goutte (méthode de "spot-wetting").

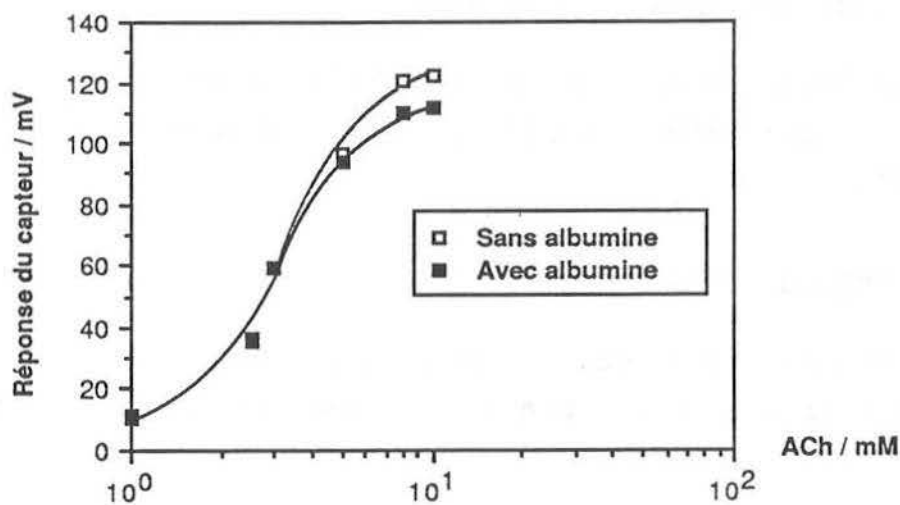


Figure 3.7 Influence de l'ASH sur la réponse du capteur à l'ACh (capteur utilisant des membranes préparées par immersion dans une solution de 25 UI.ml⁻¹ à pH 6,0).

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.5.

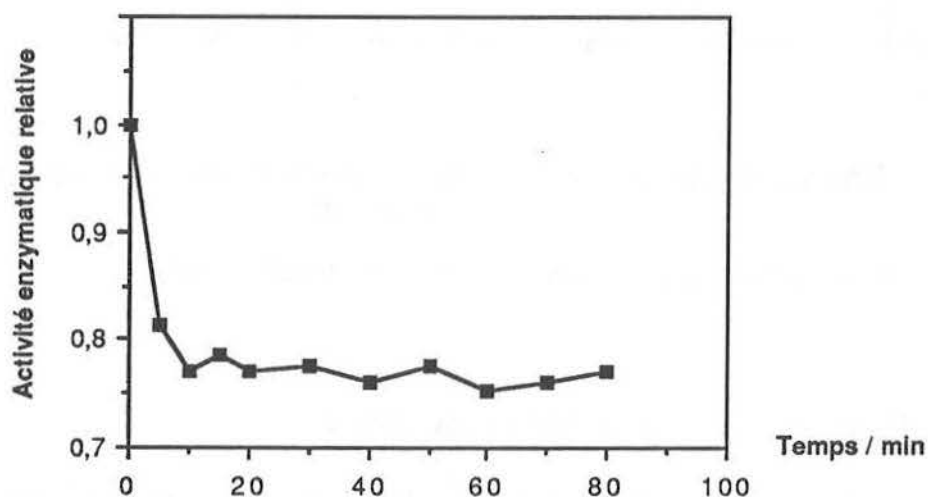


Figure 3.8 Activité résiduelle de l'AChE dans la solution d'immersion des membranes, déterminée en fonction du temps par le test d'Ellman (solution d'immersion de départ à 25 UI.ml⁻¹ et à pH 6,0).

3.2.1.3 Membrane préparée par dépôt de goutte

Ici, chaque disque membranaire de 7 mm est traité individuellement par mouillage par une solution contenant l'enzyme (défini dans le §.2.3.5.2 (b)). Le volume maximum de charge sur la membrane est de 15 μl .

a. Réponse du capteur

Pour le dosage des inhibiteurs de l'enzyme utilisant ces membranes, une quantité de 5 UI est considérée comme suffisante pour obtenir un signal assez élevé. La Figure 3.9 montre la courbe de réponse de la membrane faite avec 5 UI.

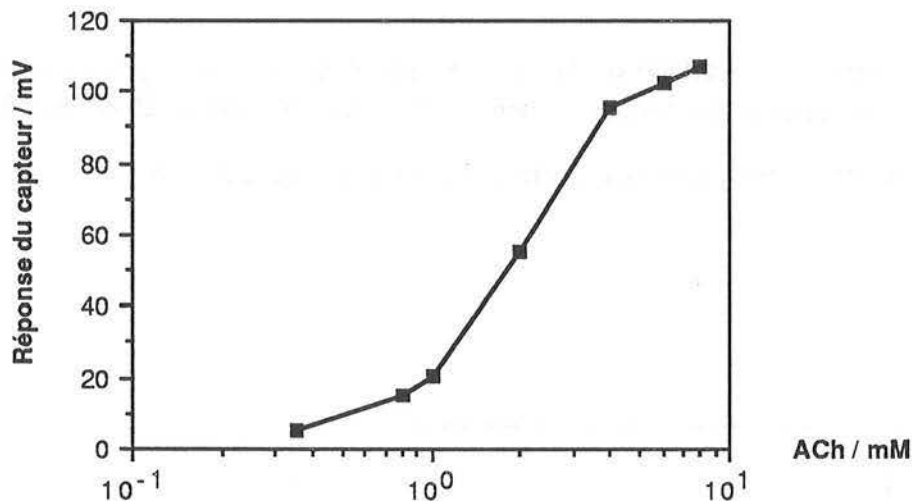


Figure 3.9 Réponse du capteur à l'ACh, à partir d'une membrane préparée par dépôt de 5 UI d'enzyme.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.5.

b. Durée de vie de la membrane en flux continu

L'un des majeurs inconvénients rencontrés dans l'utilisation des membranes PALLTM est la perte rapide de l'activité enzymatique au cours de l'expérimentation, et par conséquent, une durée de vie membranaire courte. La perte de l'activité est due au relargage rapide de l'enzyme chaque fois que la membrane est rincée. Ceci est confirmé par le contrôle de l'activité d'une solution de tampon de travail de 20 ml, sous agitation magnétique, dans laquelle le capteur avec une membrane de 5 UI est laissé immergé. Au bout de 30 minutes, la solution tampon contient environ $0,2 \text{ UI.ml}^{-1}$ (soit un relargage de 4 UI sur les 5 UI déposées). Des tests ultérieurs, pour étudier le relargage de l'enzyme, seront effectués.

L'activité relative des membranes placées dans un flux continu d'eau (de façon à être dans les conditions d'utilisation du biocapteur) de 1 ml.min^{-1} est déterminée en fonction du temps et est présentée sur la Figure 3.10. Les membranes préparées avec des concentrations d'enzyme plus élevées restent actives pendant une période relativement longue. Ceci est dû au fait qu'il faut un certain temps pour relarguer l'excès d'enzyme. Alors que la membrane contenant 5 UI perd 50 % de son activité après seulement 6 heures, la membrane contenant 20 UI perd la même activité après environ 37 heures.

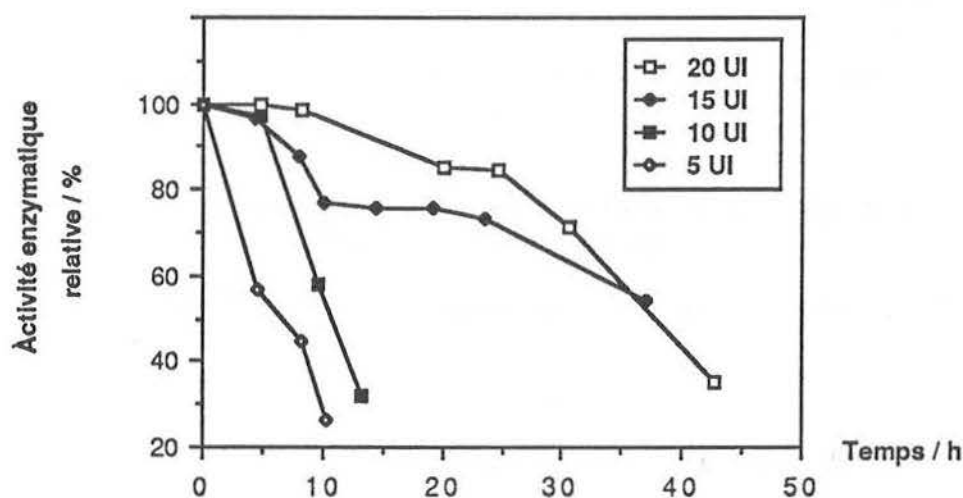


Figure 3.10 Perte d'activité de différentes membranes enzymatiques préparées par dépôt de goutte et placées dans un flux continu.

Débit d'eau : 1 ml.min^{-1} .
 Concentration d'ACh : 4,25 mM.
 Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.5.

3.2.1.4 Modifications du protocole de "dépôt de goutte"

Avec certaines modifications dans la méthode du dépôt de goutte, la durée de vie des membranes contenant 5 UI est augmentée. Après dépôt d'enzyme sur la membrane, 5 μl de tampon contenant 6 % (m/v) d'ASH sont ajoutés : la perte d'activité de 50 % n'est observée qu'après 17 heures. Des améliorations ultérieures dans la durée de vie des membranes sont observées lorsque 5 μl d'une solution contenant 2,5 % (m/v) de glutaraldéhyde dans le tampon sont ajoutés pendant l'immobilisation de l'enzyme. La membrane ne perd plus alors que 10 % de son activité initiale après 15 heures. Les résultats sont mentionnés dans la Figure 3.11.

Les quantités et les concentrations de glutaraldéhyde et d'albumine ont été optimisées par l'étude de l'amplitude et du temps du signal de réponse à une concentration de travail d'ACh de 4,25 mM. Le temps de réponse du capteur à cette concentration de substrat est de 6 à 7 minutes.

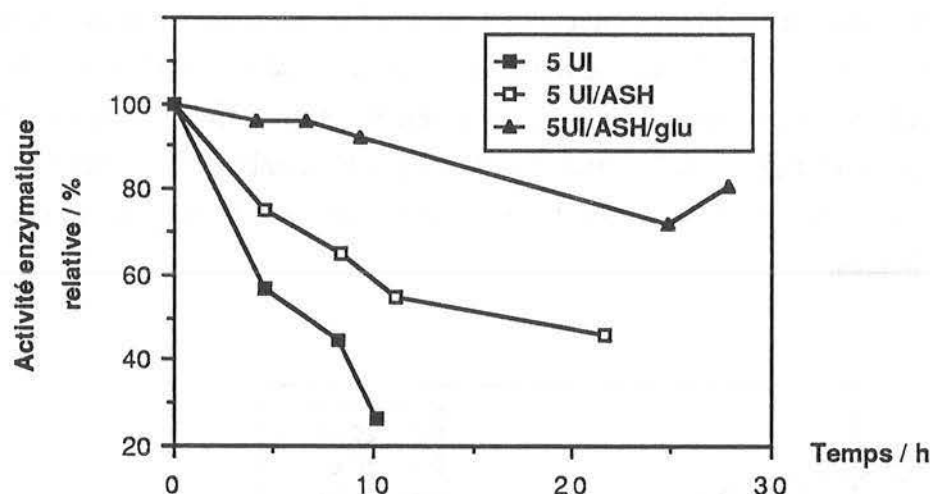


Figure 3.11 Perte d'activité de membranes enzymatiques préparées par dépôt de 5 UI d'enzyme et placées dans un flux continu.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.10.

3.2.1.5 Stabilité de la membrane dans les mesures en batch

La membrane peut être éventuellement utilisée pour le dosage des composés toxiques, en mode discontinu (mesures en batch). Cependant, nous avons décidé de contrôler la stabilité des membranes, en les testant sans inhibiteur mais en les soumettant à la même séquence d'opérations que lors des tests d'inhibition. Dans chaque cycle, cette séquence comprend :

- mesure de la réponse du biocapteur au substrat (elle sera utilisée comme témoin)
- rinçage du capteur par du tampon frais
- incubation du capteur dans le tampon sans inhibiteur pendant 30 minutes
- nouveau rinçage du capteur dans le tampon frais

Une telle analyse est aussi utile pour fixer la variation minimale de réponse qui peut être considérée comme le résultat d'une perte d'activité enzymatique due à l'inhibition, et non pas à l'incertitude de mesure.

Les mesures sont faites avec 10 membranes et les résultats obtenus sont traités statistiquement. La Figure 3.12 montre le comportement caractéristique de l'une de ces membranes pendant 10 cycles de mesures. Les résultats présentent un coefficient de variance de 2,3 % (avec un écart-type de seulement 2,16 mV), et donc une variation de 15 % du signal témoin initial peut être considérée comme limite de détection de l'inhibiteur.

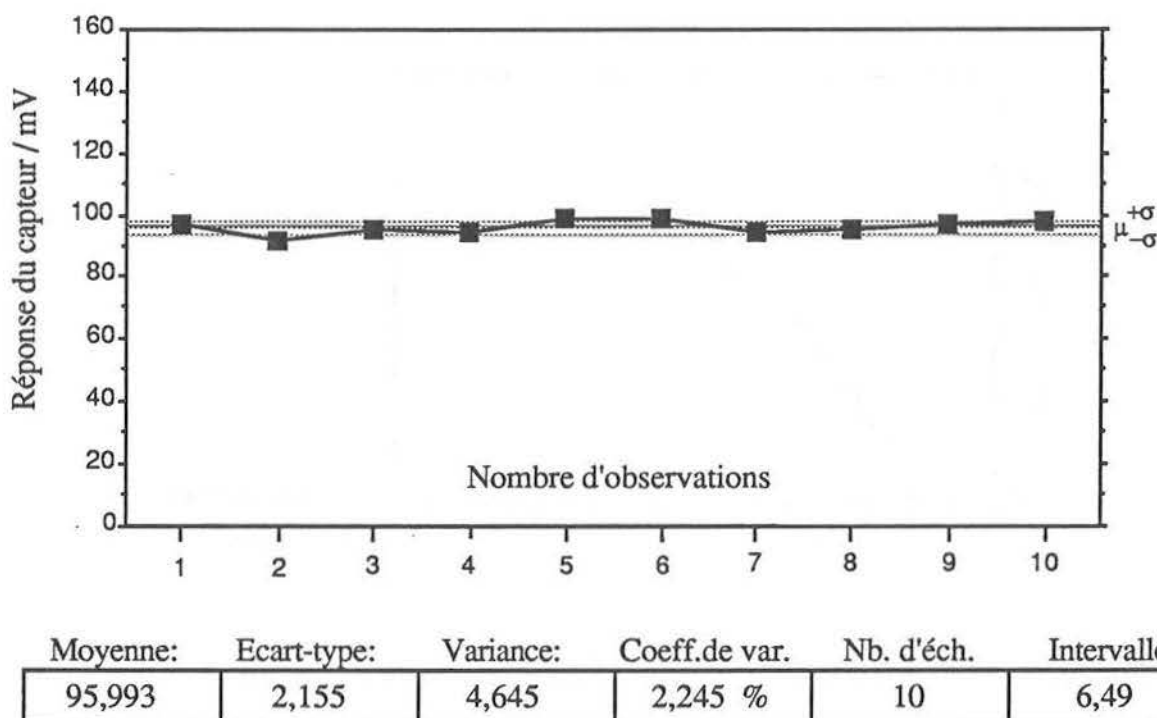


Figure 3.12 Réponse d'une membrane préparée par dépôt de 5 UI d'enzyme, lorsqu'elle est soumise à 10 cycles de mesures en batch et en l'absence d'inhibiteur.

Concentration d'ACh : 4,25 mM.

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.5.

3.2.1.6 Conditions opératoires pour le dosage de l'inhibiteur

Pour les tests d'inhibition, les conditions opératoires sont les suivantes :

Type et force ionique du tampon	: tampon phosphate de sodium à 5 mM
pH du tampon	: 7,0
Volume de travail	: 20 ml
Température	: 25°C
Concentration du substrat	: 4,25 mM
Durée d'incubation enzyme-toxique	: 30 min

3.2.1.7 Dosage des polluants toxiques

La Figure 3.13 présente la courbe d'étalonnage du Paraoxon, qui est un inhibiteur puissant des cholinestérases. Le temps d'incubation est, dans ce cas, de 5 minutes.

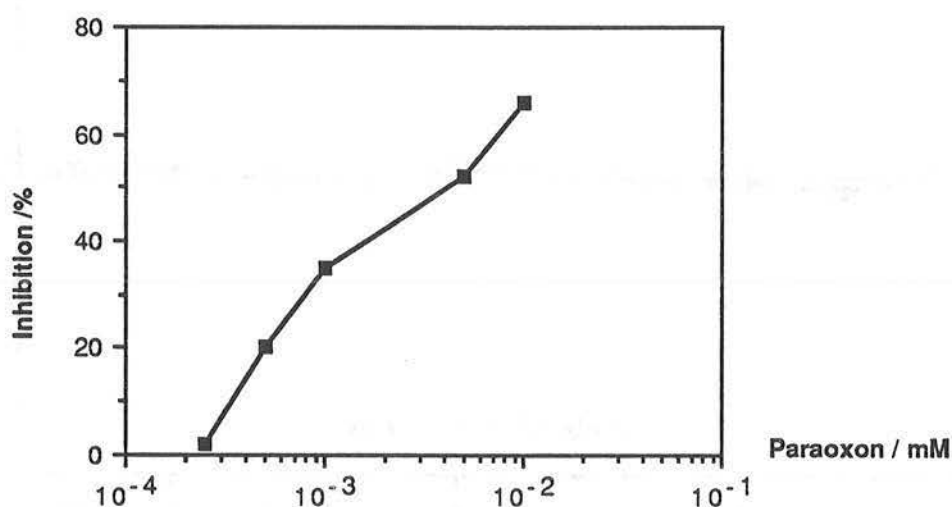


Figure 3.13 Courbe d'étalonnage du Paraoxon (temps d'incubation : 5 min).

Concentration d'ACh : 4,25 mM

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.5.

D'autres composés toxiques, tels que le Méthyl Azinphos, le Paraquat, le Malathion et le 2,4,6,Trichlorophénol, sont déterminés par inhibition de l'enzyme. Les limites de détection (concentration du composé toxique correspondant à 15 % d'inhibition) obtenues par utilisation du biocapteur sont présentées dans le Tableau 3.1.

Composé toxique	Limite de détection	Temps d'incubation : enzyme-toxique (min)
Paraoxon	0,5 μ M	5
Paraquat	0,4 mM	30
Malathion	1 mM	30
Méthyl azinphos	0,1 mM	30
2,4,6, Trichlorophénol	0,3 mM	30

Tableau 3.1 Limites de détection de différents composés toxiques, obtenues avec le biocapteur à AChE.

3.2.1.8 Reproductibilité

La reproductibilité des résultats pour le dosage des composés toxiques dépend de la reproductibilité de la préparation des membranes. Comparé au protocole du dépôt par goutte, où les membranes sont préparées individuellement, le protocole précédent dans lequel les membranes sont préparées par immersion par lots, donne une meilleure reproductibilité du signal. Cette reproductibilité a été étudiée à partir de 10 membranes préparées selon chacun des deux protocoles. Les résultats sont montrés dans la Figure 3.14. Les coefficients de variance du signal témoin obtenus pour les membranes préparées par immersion par lots et par dépôt de goutte sont respectivement de 2,6 % et 11,7 %.

3.2.1.9 Stabilité des membranes stockées

Les membranes enzymatiques montrent une très bonne stabilité au cours du stockage. Les membranes préparées et stockées sèches à 4°C, gardent une activité constante même après une période de 3 années.

Conclusions

- Le protocole fourni par le fabricant pour l'immobilisation de l'enzyme sur des membranes PALL™ a été, à la fois, amélioré et simplifié. Avec le protocole amélioré, les membranes ne perdent que 10 % de leur activité initiale après 15 heures d'utilisation en continu. La préparation des membranes prend moins d'une heure alors que la procédure initiale nécessitait un jour entier environ.

- Les membranes enzymatiques sont utilisées avec succès pour le dosage des polluants toxiques, tels que le Paraoxon, le Méthyl Azinphos, le Paraquat, le Malathion et le 2,4,6, Trichlorophénol.

- Etant donné la durée de vie relativement courte de ces membranes enzymatiques, un temps d'incubation de seulement 30 minutes est choisi pour le dosage des composés toxiques, même si de meilleures limites de détection peuvent être obtenues après un temps d'incubation plus long entre l'enzyme et le composé toxique. Pour cette raison aussi, nous n'avons pas tenté de régénérer l'enzyme après l'inhibition.

- Les limites de détection (correspondant à 15 % d'inhibition) des composés toxiques testés varient de 0,5 µM pour le Paraoxon à 1 mM pour le Malathion.

- De telles membranes sont plus adaptées à une seule utilisation. Une fois inhibée, la membrane doit être jetée.

- Cependant, l'avantage de la meilleure reproductibilité dans le cas des membranes préparées par lots selon le protocole initial (coeff.de var. = 2,6 %, pour n = 10), est perdu dans le protocole amélioré (coeff.de var. = 11,7 %, pour n = 10).

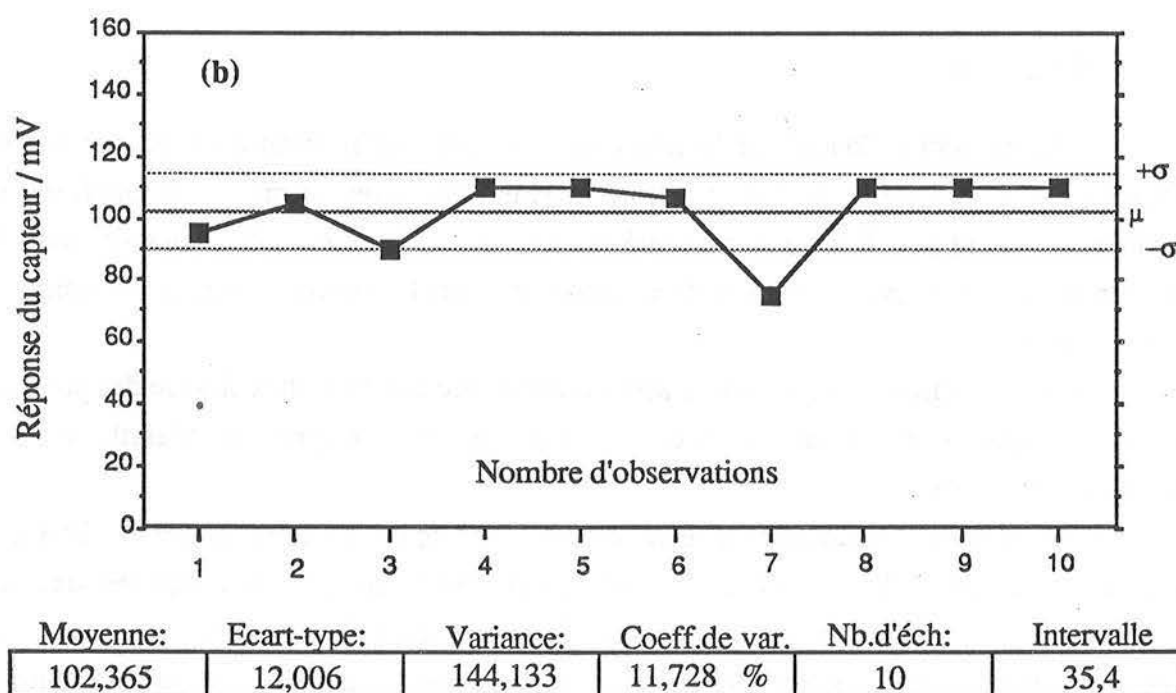
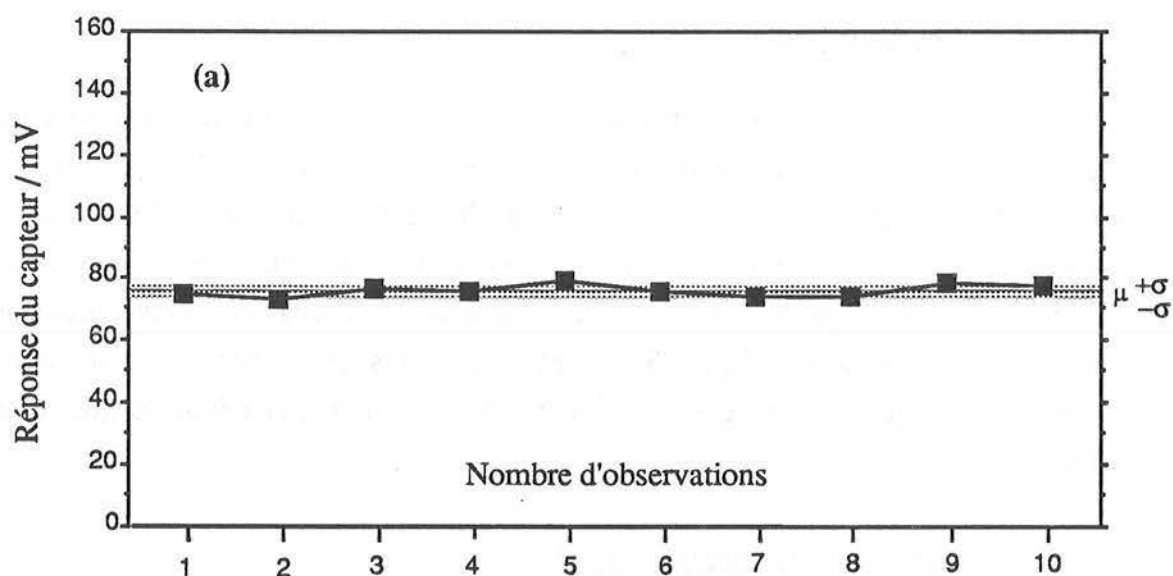


Figure 3.14 Analyse statistique de la reproductibilité de réponse du capteur utilisant des membranes préparées par (a) immersion dans une solution à 25 UI.ml⁻¹ et (b) dépôt de goutte d'une solution à 5 UI.

3.2.2 BIOCAPTEUR A HYDRAZIDE DU COPOLYMERE D'ACRYLAMIDE ET DE METHACRYLAMIDE CHARGE PAR DE L'ACHE

3.2.2.1 Préparation et caractéristiques du copolymère

Certaines modifications mentionnées par Tor et Freeman [15] sont appliquées au procédé original pour la préparation du polymère. La polymérisation des monomères est effectuée pendant une durée de deux heures au lieu d'une heure. La séparation du précipité de copolymère dans le méthanol froid est faite par centrifugation à 4°C, à la place d'une filtration.

La composition du copolymère est déduite d'une analyse par RMN. La Figure 3.15 montre le spectre en RMN ^{13}C du copolymère. Le rapport des intensités de pics correspondant aux atomes de carbone des groupements $\text{C}=\text{O}$ de l'acrylamide et du méthacrylamide, donne une composition de 60 % en acrylamide et 40 % en méthacrylamide.

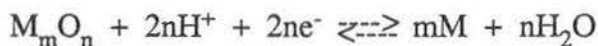
La chaîne du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide est partiellement substituée avec des groupes hydrazides qui participent à la réticulation chimique avec les dialdéhydes, pour former le gel. La Figure 3.16 montre le copolymère hydrazide réticulé avec le glyoxal.

Le contenu en hydrazide d'acyle du polymère que nous avons synthétisé est approximativement de $600 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de polymère sec, comparé aux $800 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de polymère sec, préparé par la méthode de Tor et Freeman [15].

3.2.2.2 Choix du transducteur (Pd/PdO , Ir/IrO_2 et verre)

Une électrode de verre n'est pas l'unique système de mesure de pH. Un couple métal-oxyde métallique tel que le palladium et son oxyde, ou l'iridium et son oxyde, peut être aussi considéré comme capteur de pH.

En effet, des métaux mis en contact avec leurs oxydes insolubles constituent un couple rédox qui, dans de nombreux cas, répond au changement de concentration en ions hydroxydes. En émettant l'hypothèse de la réversibilité [73], ce couple peut être présenté par l'équation générale suivante :



Aussi, nous testons d'abord les deux couples, Pd/PdO et Ir/IrO_2 , comme capteurs de pH. Les réponses sont pratiquement Nernstiennes pour les deux électrodes ($59 \pm 5\text{mV}$). Puis

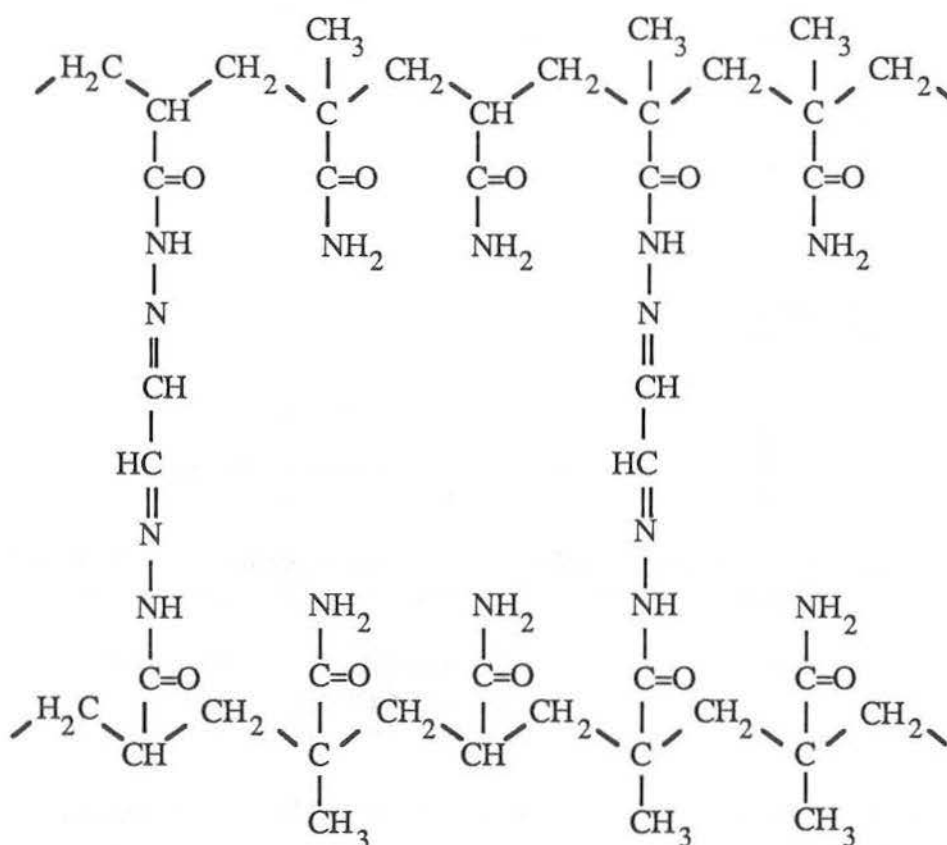


Figure 3.16 Réticulation de l'hydrazide du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide avec le glyoxal.

nous cherchons à les utiliser comme biocapteurs, après revêtement par une enzyme, pour les deux raisons suivantes :

- les enzymes étudiées catalysent des réactions qui forment des ions H^+ ,
- ces biocapteurs à fil métallique revêtu présentent des caractéristiques intéressantes : robustesse, simplicité de fabrication et miniaturisation [74].

Nous revêtons donc ces électrodes avec de l'AChE comme décrit dans le § 2.3.5.3 (a), puis nous étudions leurs performances comme capteurs à ACh. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus avec les électrodes de verre.

3.2.2.3 Réponse du capteur à l'ACh

La Figure 3.17 présente la réponse de 3 électrodes différentes à une concentration de 1,5 mM d'ACh, en fonction du temps. Elle montre que 90 % du potentiel stationnaire est obtenu en 4 minutes par l'électrode de verre, alors que pour les deux électrodes, Pd/PdO et Ir/IrO₂, ce

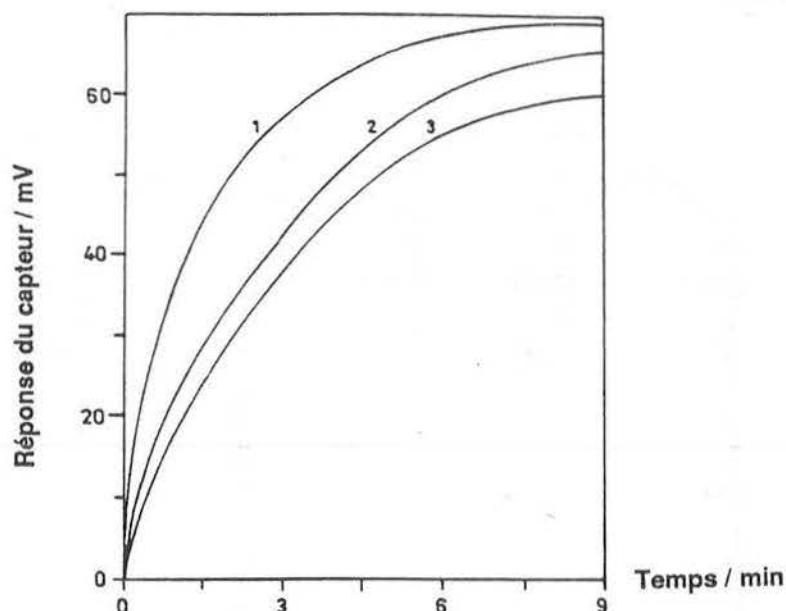


Figure 3.17 Courbes de réponse des biocapteurs à une concentration d'ACh de 1,5 mM. (1) Electrode de verre (2) Electrode de Pd/PdO (3) Electrode de Ir/IrO₂.

Conditions opératoires : Tampon HEPES 5 mM à pH 8,0.
Volume de travail : 20 ml.
Température : 25°C.

temps est d'environ 6 minutes. La Figure 3.18 montre les courbes d'étalonnage des 3 électrodes pour le dosage de l'ACh. La gamme de détection d'ACh est comprise entre 0,1 mM et 4 mM, avec les conditions opératoires mentionnées en légende. Il faut également observer que l'amplitude de la réponse obtenue avec l'électrode de verre est beaucoup plus importante (43 mV) que celle présentée précédemment (27 mV) par Tor et Freeman [15], pour une concentration d'ACh de

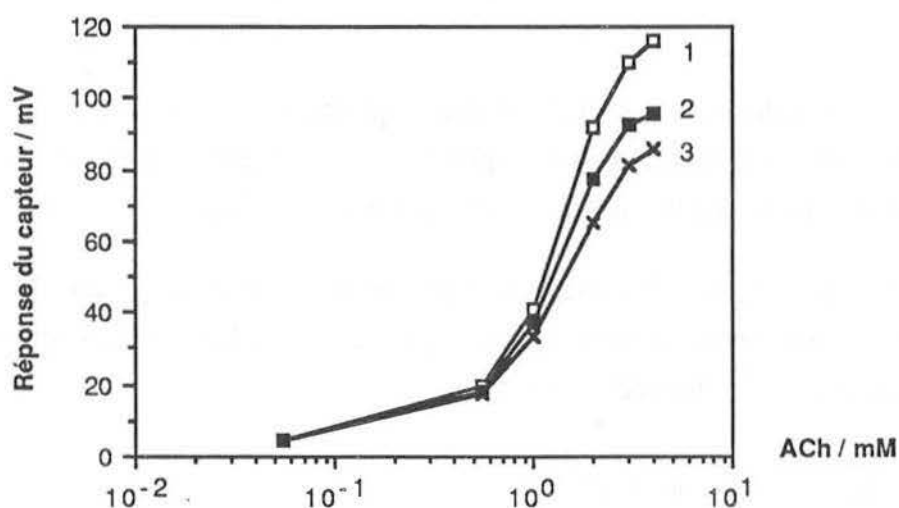


Figure 3.18 Réponses des biocapteurs à différentes concentrations en ACh. (1) Electrode de verre (2) Electrode de Pd/PdO (3) Electrode de Ir/IrO₂.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.17.

1 mM. Ceci peut être attribué à la concentration supérieure en copolymère (25 % (m/v), contre 20 % (m/v) employée par Tor et Freeman [15]), que nous utilisons dans les immobilisations, ce qui entraîne une réticulation plus forte du gel et par conséquent, une meilleure rétention de l'enzyme. Cette réticulation plus importante limite la diffusion du substrat, ce qui explique aussi les temps de réponse relativement longs obtenus avec nos électrodes (6 à 7 minutes contre 3 à 4 minutes obtenues par Tor et Freeman [15]).

Comme les électrodes de verre répondent relativement rapidement, par rapport aux deux autres électrodes, nous les avons choisies pour le dosage des inhibiteurs.

3.2.2.4 Effet de la force ionique du tampon

Avec une concentration de tampon de 1 mM, la réponse de l'électrode est élevée, mais le bruit de fond est important. Quand la concentration du tampon augmente, la réponse décroît. A une concentration de 2,5 mM le pouvoir tampon est suffisant et assure une réponse satisfaisante avec un bruit de fond relativement réduit. Cette concentration de 2,5 mM de tampon HEPES a donc été retenue.

3.2.2.5 Effet du pH du tampon

La Figure 3.19 montre la réponse du capteur quand le pH varie de 6,5 à 9,0. On note un maximum à pH 8,0. Dans les tests qui suivent, le pH du tampon est donc fixé à 8,0.

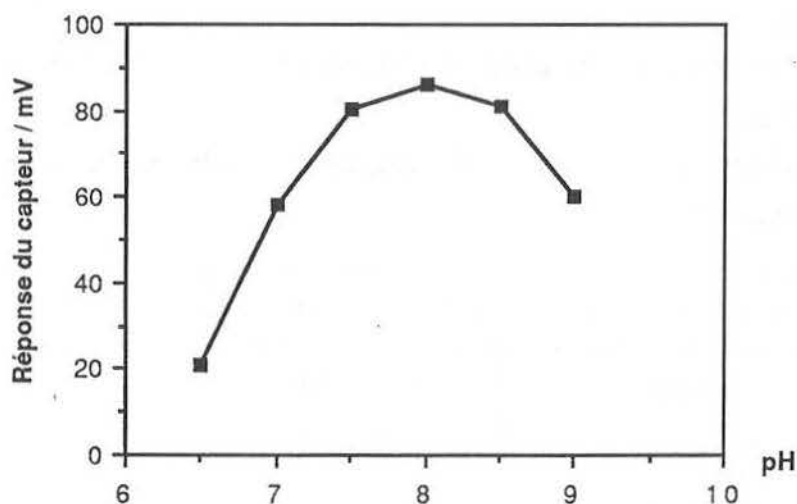


Figure 3.19 Effet du pH sur la réponse du biocapteur.

Conditions opératoires : Tampon HEPES 2,5 mM.
Concentration en ACh : 2 mM.
Température : 25°C.

3.2.2.6 Conditions opératoires pour le dosage d'inhibiteur

Pour les tests d'inhibition, les conditions opératoires sont les suivantes :

Type et force ionique du tampon	: HEPES à 2,5mM, contenant 20 mM de $MgCl_2$, 100mM de NaCl, 0,01 % (m/v) de gélatine.
pH du tampon	: 8,0
Volume de travail	: 20 ml
Température	: 25°C
Concentration du substrat	: 5 mM
Durée d'incubation enzyme-toxique	: 60 min

3.2.2.7 Dosage des polluants toxiques

Le biocapteur à AChE est utilisé pour le dosage de plusieurs inhibiteurs des cholinestérases.

La nicotine

La Figure 3.20 indique la courbe d'étalonnage de la nicotine. La gamme analytique pour le dosage de la nicotine est comprise entre 10^{-2} mM et 1 mM.

Les ions fluorures

La Figure 3.21 montre la courbe d'étalonnage pour le dosage des ions fluorures. La gamme détectée s'étend de 10^{-2} mM à $2 \cdot 10^2$ mM.

Les pesticides

Les courbes d'étalonnage du Paraoxon, du Malathion et du Méthyl Parathion sont indiquées dans les Figures 3.22 (a - c).

Les limites de détection (pour 5 % d'inhibition) de ces différents composés toxiques sont présentées dans le Tableau 3.2.

Composé toxique	Limite de détection
Nicotine	0,01 mM
Fluorure	0,01 mM
Paraoxon	1 nM
Malathion	0,1 nM
Méthyl Parathion	1 nM

Tableau 3.2 Limites de détection de différents composés toxiques, obtenues avec le biocapteur à AChE.

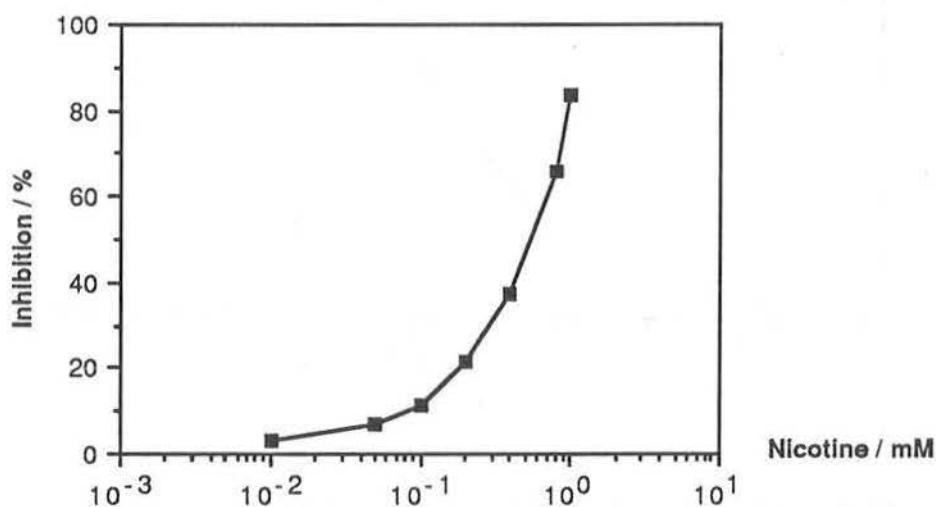


Figure 3.20 Courbe d'étalonnage de la nicotine obtenue avec le biocapteur.

Conditions opératoires : Tampon HEPES 2,5 mM à pH 8,0.
Concentration d'ACh : 5 mM.
Volume de travail : 20 ml.
Température : 25°C.

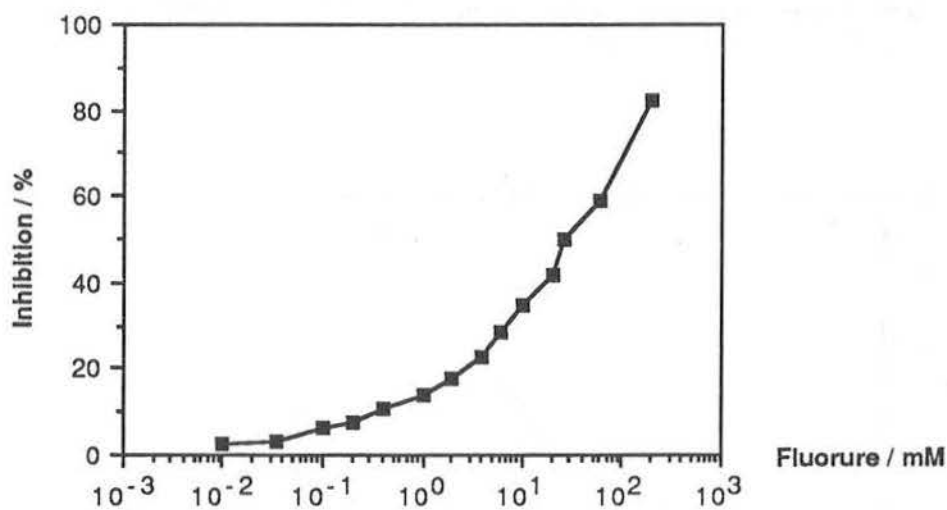


Figure 3.21 Courbe d'étalonnage des ions fluorures, obtenue avec le biocapteur.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.20.

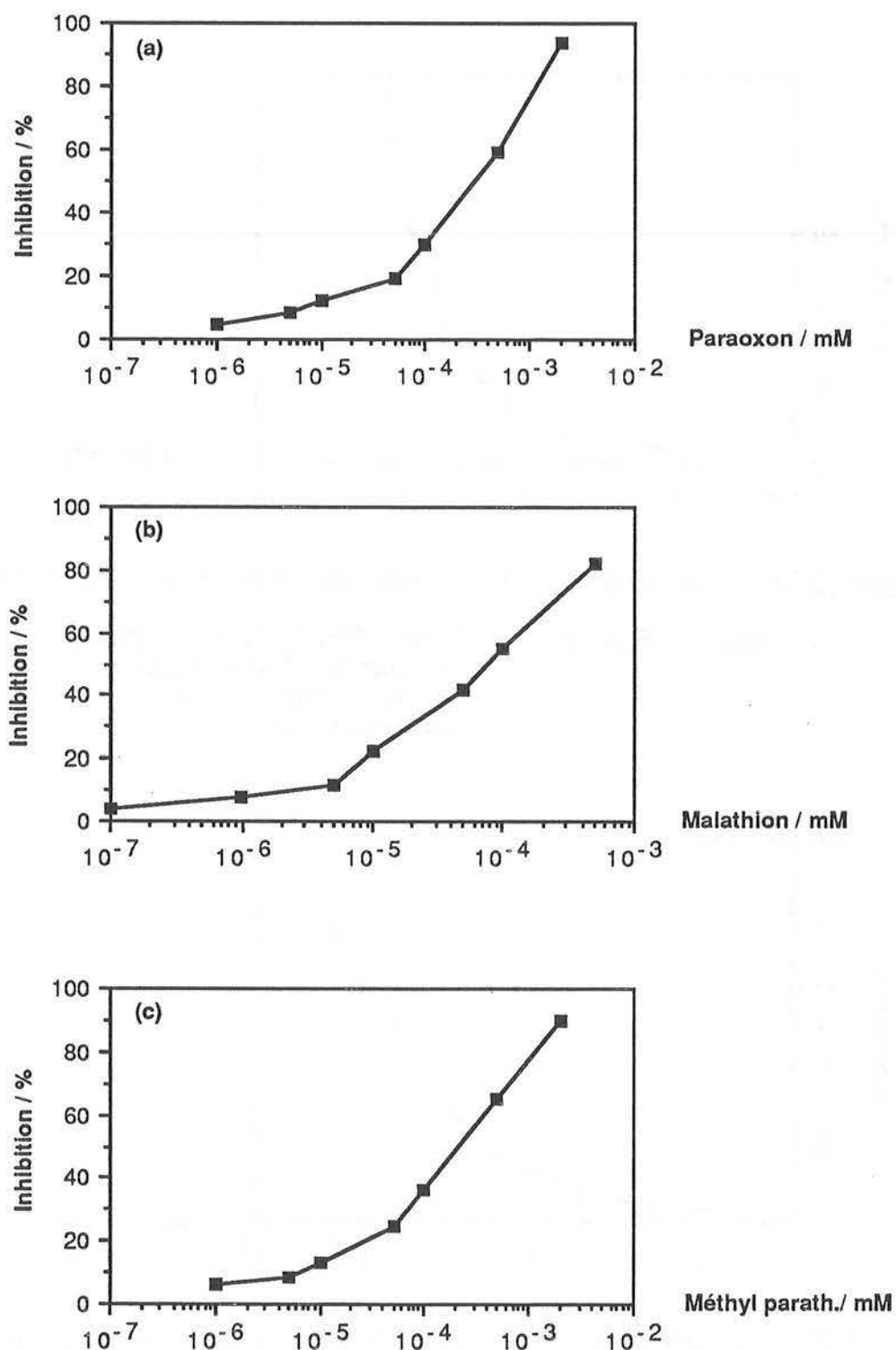


Figure 3.22 Courbes d'étalonnage (a) du Paraoxon (b) du Malathion (c) Méthyl Parathion, obtenues avec le biocapteur à AChE.

Temps d'incubation : 1 heure

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.20.

3.2.2.8 Régénération de l'enzyme

La régénération complète de l'enzyme inhibée est possible après inhibition par un inhibiteur réversible compétitif, tels que les ions fluorures ou la nicotine. En accord avec le mécanisme d'inhibition présenté dans le Tableau 1.2, elle est obtenue par rajout de substrat en présence de l'inhibiteur. La Figure 3.23 montre la régénération de l'enzyme après inhibition par 10 mM d'ions fluorures.

Comme le complexe enzyme-inhibiteur est beaucoup plus fortement lié dans le cas des organophosphates, la réactivation complète de l'enzyme inhibée n'est possible que si l'enzyme est partiellement inhibée [36]. L'AChE est inhibée jusqu'à 66 % par $5 \cdot 10^{-7}$ M de Paraoxon et est complètement régénérée en 15 minutes par addition d'une solution de 2-PAM 1 mM dans la cellule de travail, comme montré sur la Figure 3.24. Pour le même temps, la réactivation à 100 % de l'enzyme n'est pas possible si l'enzyme est inhibée à un niveau supérieur à 66 %.

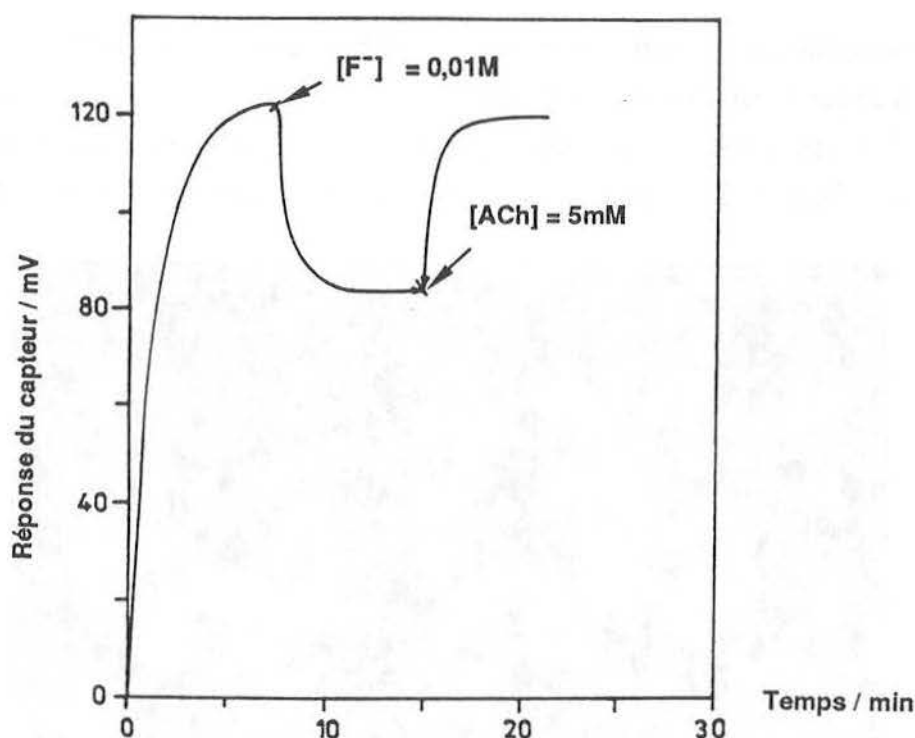


Figure 3.23 Inhibition par les ions fluorures et réactivation de l'AChE.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.20.

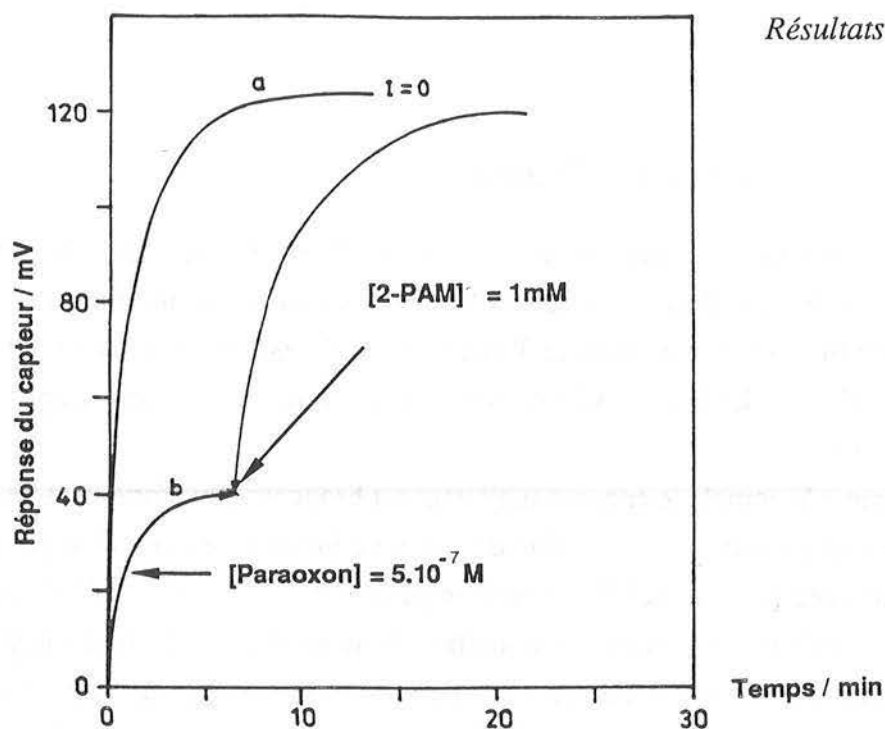


Figure 3.24 Réponse caractéristique du biocapteur à AChE (a) en absence et (b) en présence de Paraoxon 1 mM et après régénération.

Temps d'incubation : 1 heure

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.20.

3.2.2.9 Stabilité du biocapteur

La stabilité du biocapteur au cours de son stockage et au cours de son utilisation est surtout déterminée par la capacité du gel de polymère à rester physiquement attaché à la membrane de l'électrode. Des durées de vie plus courtes apparaissent lorsque le gel craque ou s'écaille durant son emploi. La Figure 3.25 montre un film de polymère constituant la membrane,

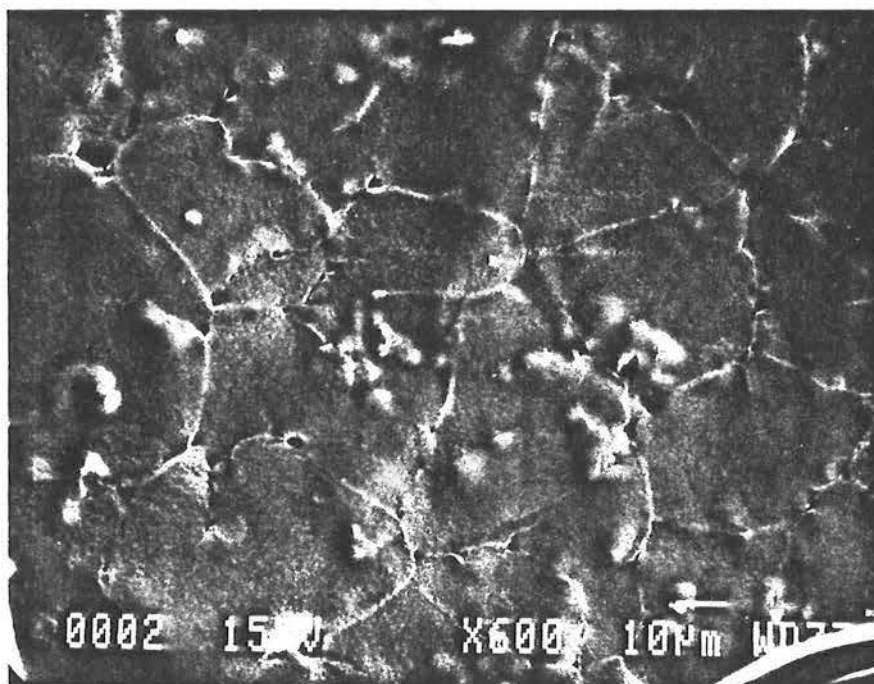


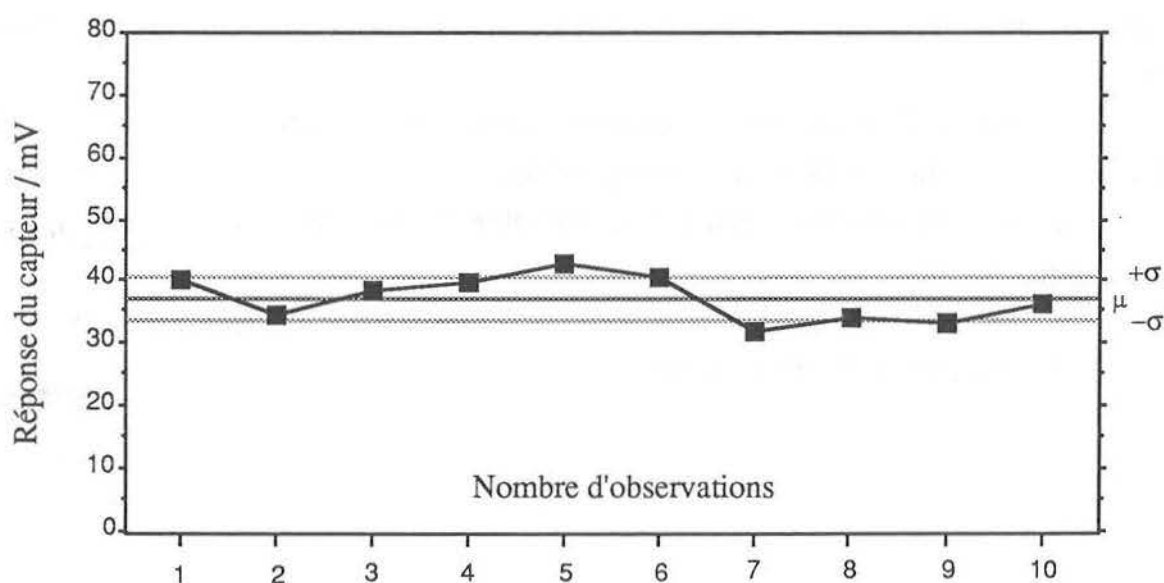
Figure 3.25 Apparence de la membrane copolymère vue au microscope électronique. Grossissement : x 600.

observé sous microscope électronique. La membrane a une épaisseur moyenne de 50 μm .

Pendant leur fonctionnement en continu à 25°C, les capteurs perdent environ 20 % de leur activité initiale après une période de 5 jours.

3.2.2.10 Reproductibilité

Les électrodes étant préparées individuellement par trempage dans une solution de copolymère, une analyse statistique de la réponse des biocapteurs à 1,5 mM d'ACh, est faite pour déterminer la reproductibilité des signaux mesurés. La Figure 3.26 présente les résultats obtenus pour 10 électrodes différentes. Un coefficient de variance de 9,8 % est observé.



Moyenne:	Ecart-type:	Variance:	Coeff.de var.	Nb d'éch:	Intervalle
37,14	3,654	13,354	9,839 %	10	11

Figure 3.26 Analyse statistique de la reproductibilité des signaux du biocapteur.

Conclusions

- Certaines modifications sont faites dans le procédé classique de la préparation des hydrazides du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide, de façon à obtenir un meilleur rendement de copolymérisation. Une polymérisation de 2 heures, au lieu d'une heure, est effectuée, puis la séparation du précipité est faite par centrifugation et non par filtration.

- Le spectre en RMN ^{13}C du copolymère montre une composition de 60 % en acrylamide et 40 % en méthacrylamide.

- 3 électrodes potentiométriques (Pd/PdO, Ir/IrO₂ et verre) sont recouvertes par un mélange d'AChE et de copolymère, et utilisées pour le dosage de l'ACh. L'électrode de verre présente le signal le plus élevé et le temps de réponse le plus court (4 minutes), pour une concentration d'ACh de 1,5 mM.

- L'électrode de verre à AChE est utilisée pour le dosage d'inhibiteurs réversibles tels que la nicotine et les ions fluorures. L'enzyme inhibée peut être aisément réactivée par addition d'ACh supplémentaire qui entre alors en compétition avec les inhibiteurs au niveau des sites actifs de l'enzyme.

- Des insecticides organophosphorés tels que le Paraoxon, le Malathion et le Méthyl-Parathion sont aussi dosés avec ce capteur. Il est possible, par addition de 1 mM d'une solution de 2-PAM dans la cellule de travail, de réactiver complètement l'enzyme, si l'inhibition ne dépasse pas 66 %.

- Les limites de détection des composés toxiques testés varient de 0,1 nM pour le Malathion à 0,01 mM pour la nicotine et les ions fluorures.

- La possibilité de réactivation de l'enzyme inhibée permet la réutilisation des capteurs pour de nombreux dosages.

- En raison de la préparation individuelle de ces capteurs, la reproductibilité du signal est faible (coeff.de var. = 9,8 %, pour n = 10).

3.2.3 BIOCAPTEURS A BUCHE POUR LE DOSAGE D'INHIBITEURS : COMPARAISON DE DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMMOBILISATION ENZYMATIQUE

Les performances des biocapteurs pour le dosage de certains insecticides tels que le Paraoxon, le Carbaryle et le Carbofurane, sont étudiées en comparant différents procédés d'immobilisation de la BuChE. Les méthodes d'immobilisation d'enzymes utilisant les membranes PALL™ pré-activées et les hydrazides du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide, sont comparées [75] à la méthode d'immobilisation sur les toiles de Nylon™, auparavant développée au laboratoire [36] pour la construction de capteurs de mesure de toxicité.

3.2.3.1 Préparation de capteurs pour la mesure de la toxicité

Les différentes méthodes adoptées pour l'immobilisation de la BuChE sont mentionnées en détail dans les § 2.3.5.2 à 2.3.5.4. Les membranes PALL™ sont préparées individuellement par la technique de dépôt par goutte. Les électrodes à gel constitué du copolymère sont préparées par la technique de revêtement par immersion. Les membranes de Nylon™ sont également préparées à l'aide d'un mélange d'enzyme, d'ASH et de glutaraldéhyde, étalé sur une large pièce de toile de Nylon™ qui est ensuite découpée en petits disques.

3.2.3.2 Quantité d'enzyme utilisée

L'activité de la BuChE est d'abord testée par la méthode d'Ellman afin de connaître la quantité nécessaire d'enzyme à immobiliser. Chaque technique d'immobilisation est démarrée avec 4 UI. L'expérience, dans notre laboratoire, montre que cette concentration d'enzyme n'est pas assez élevée pour obtenir des limites de détection faibles mais elle est néanmoins suffisante pour produire un signal mesurable.

La performance du capteur dépend directement de la quantité finale d'enzyme présente dans le système. Or, les différentes étapes du procédé d'immobilisation, lui-même, entraînent une perte d'enzyme ou de son activité et donc, nous ne pouvons pas évaluer exactement la quantité finale d'enzyme sur le capteur. Aussi, pour pouvoir comparer les résultats, nous débutons avec une concentration de 4 UI, qui est alors admise comme référence.

3.2.3.3 Conditions opératoires pour le dosage des inhibiteurs

Des conditions opératoires identiques sont employées, de façon à tester et comparer la performance de 3 systèmes différents d'immobilisation. Ces conditions sont précisées ci-dessous :

Type et force ionique du tampon	: HEPES à 2,5 mM, contenant 20 mM de MgCl ₂ , 100 mM de NaCl, 0,01 % (m/v) de gélatine.
---------------------------------	--

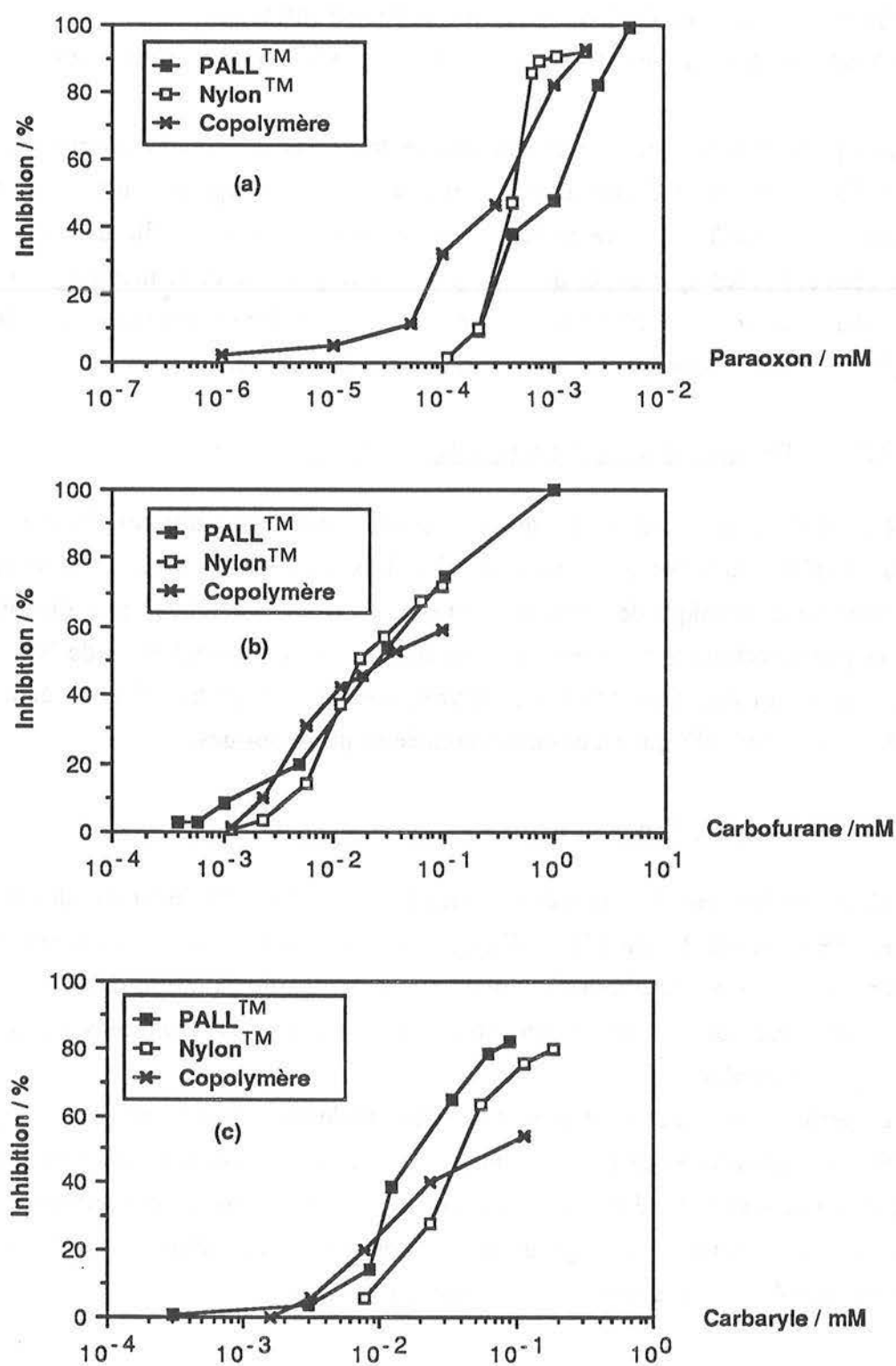


Figure 3.27 Courbes d'étalonnage du (a) Paraoxon (b) Carbofurane et (c) Carbaryle, obtenues avec les biocapteurs à BuChE.

Conditions opératoires : Tampon HEPES 2,5 mM à pH 7,6.
 Concentrations en BuCh : 1,5 mM.
 Volume de travail : 15 ml, Température : 25°C.
 Temps d'incubation : 30 min.

pH du tampon	: 7,6
Volume de travail	: 15 ml
Température	: 25°C
Concentration du substrat	: 1,5 mM
Durée d'incubation enzyme-toxique	: 30 min

3.2.3.4 Dosage du Paraoxon, du Carbaryle et du Carbofurane

Les courbes d'étalonnage obtenues pour le dosage de ces différents insecticides sont présentées sur les Figures 3.27 (a - c). Elles montrent que la technique d'immobilisation n'altère pas, apparemment, la performance de l'électrode comme capteur de mesure de la toxicité. En effet, nous n'avons pas noté de différences significatives pour la sensibilité et la limite de détection des insecticides testés. Cependant, pour le Paraoxon, l'enzyme immobilisée dans le système de copolymère montre une limite de détection 4 fois plus basse. Une explication possible de ce phénomène pourrait être une concentration d'enzyme relativement plus basse présente en fin du procédé d'immobilisation. Le Tableau 3.3 précise les limites de détection, correspondant à 10 % d'inhibition, obtenues avec les capteurs pour les différents insecticides.

Insecticide Système d'immobilisation	Paraoxon	Carbofurane	Carbaryle
Membrane PALL TM	0,20 μ M	1,5 μ M	6 μ M
Membrane en Nylon TM	0,20 μ M	4,5 μ M	10 μ M
Membrane en copolymère	0,05 μ M	2,5 μ M	4 μ M

Tableau 3.3 Limites de détection des insecticides observées avec les différents biocapteurs (correspondant à 10 % d'inhibition).

3.2.3.5 Reproductibilité du capteur

La reproductibilité du capteur pour les mesures de substrat et, par conséquent des insecticides, dépend de la reproductibilité du nombre de sites actifs enzymatiques immobilisés sur la membrane. Evidemment, les membranes ou les capteurs préparés par lots tendent à montrer des résultats plus homogènes comparés aux résultats obtenus pour les membranes ou capteurs préparés individuellement (comme on l'a vu précédemment avec les membranes PALLTM). La technique d'immobilisation sur toile de NylonTM donne des résultats plus reproductibles que

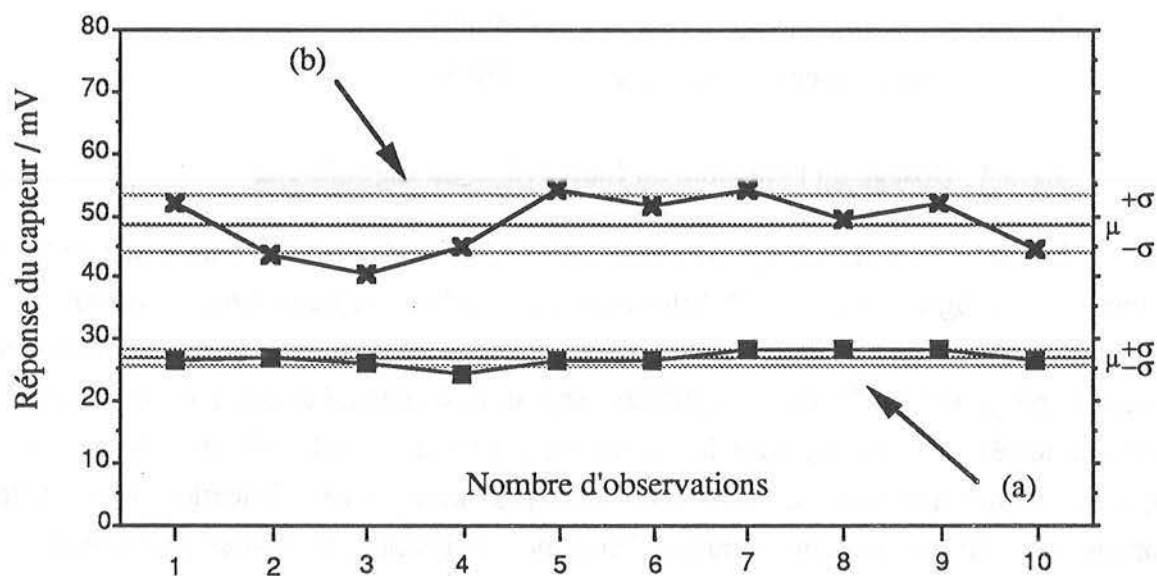


Figure 3.28 Reproductibilité des signaux obtenus avec des capteurs utilisant des membranes PALL™ préparées (a) par immersion (b) par dépôt de goutte.

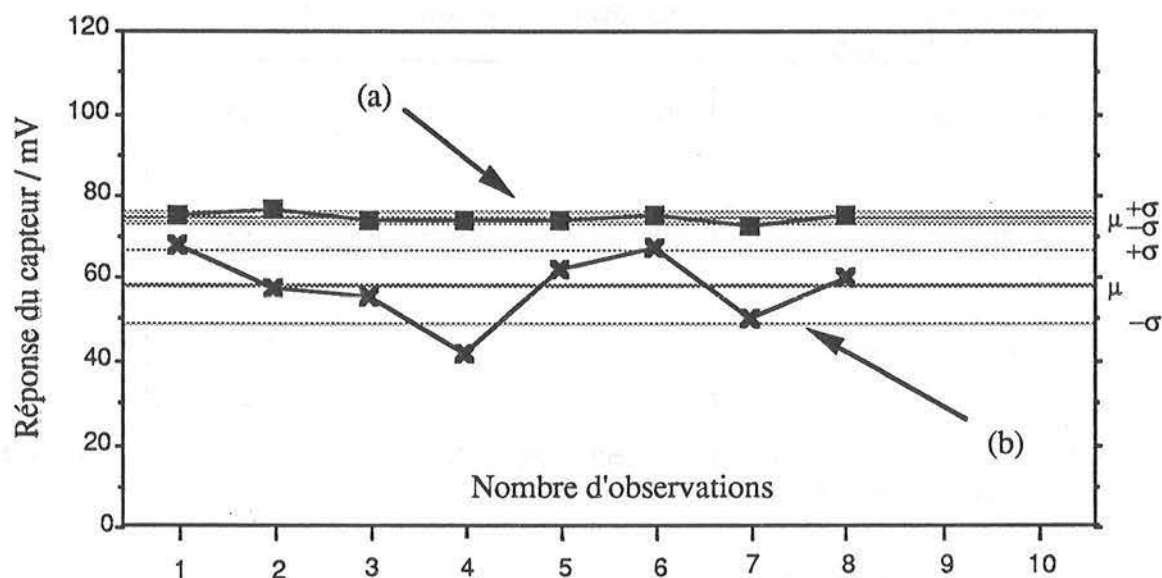


Figure 3.29 Reproductibilité des signaux obtenus avec des capteurs utilisant (a) des membranes de Nylon™ et (b) des membranes de copolymère.

Conditions opératoires : Tampon HEPES 2,5 mM à pH 7,6.
 Concentration en BuCh : 1,5 mM.
 Volume de travail : 15 ml.
 Température : 25°C.

les deux autres techniques, puisque la solution d'enzyme est homogénéisée sur la toile, qui est ensuite découpée en petits disques.

Afin de comparer la reproductibilité entre préparation par lots (par immersion dans une solution d'enzyme) et préparation individuelle (par dépôt de goutte), nous avons fait une analyse statistique de la réponse des capteurs à BuChE immobilisée sur disques en membrane PALL™.

Pour une concentration de 1,5 mM en substrat, le coefficient de variance du signal de réponse pour les membranes préparées individuellement est de 9,8 % ($n = 10$), alors qu'il est de 4,73 % ($n = 10$) pour les membranes préparées par lots.

Ces résultats montrent à nouveau que les membranes préparées individuellement présentent une reproductibilité moins bonne. Une analyse similaire est faite pour les capteurs à BuChE avec copolymère. Ces électrodes étant préparées individuellement, un coefficient de variance relativement élevé de 14,9 % ($n = 8$), du signal de réponse, à une concentration de substrat de 1,5 mM, est trouvé. Les membranes en toile de Nylon™ contenant la BuChE montrent une meilleure reproductibilité du signal avec un coefficient de variance de 1,6 % ($n = 8$). Les analyses des réponses de ces 3 capteurs à BuChE sont présentées dans les Figures 3.28 et 3.29.

3.2.3.6 Stabilité du capteur

La Figure 3.30 montre la stabilité en utilisation continue ou la capacité de ces 3 biocapteurs différents à fonctionner dans un système analytique. Ici, les capteurs sont laissés sans interruption, dans un milieu tampon agité par un barreau magnétique, à 25°C. Pour contrôler périodiquement l'activité de l'enzyme, le substrat est ajouté dans le tampon et le signal de réponse est enregistré.

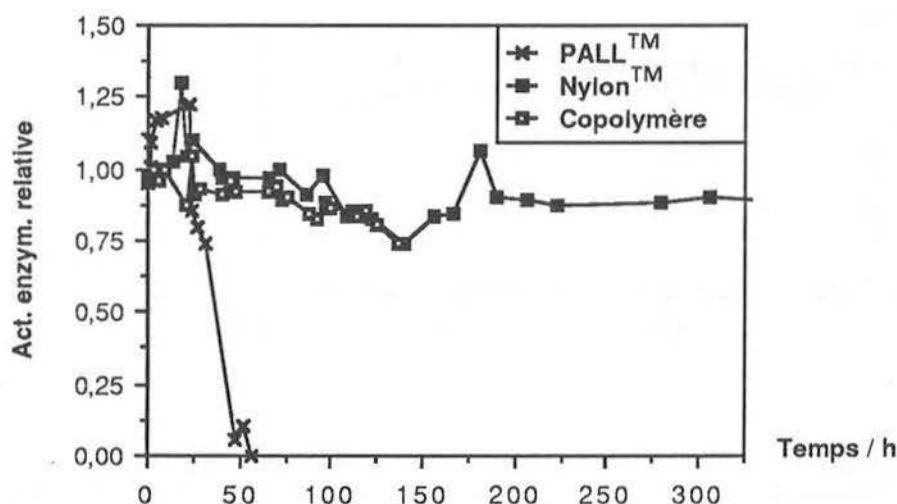


Figure 3.30 Stabilité des différents biocapteurs pendant leur utilisation en continu, à 25°C.

Conditions opératoires identiques à celles des Figures 3.28/29.

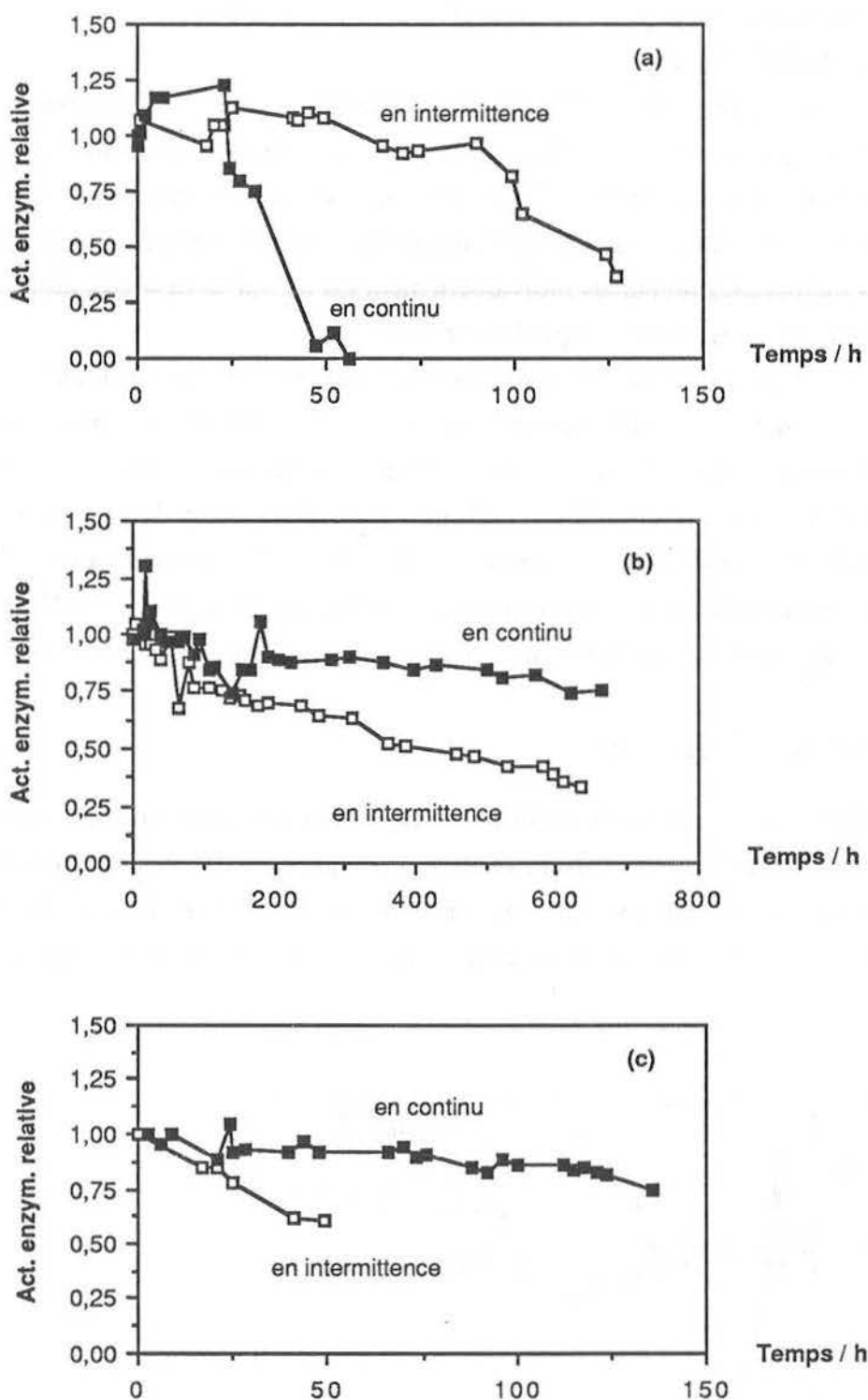


Figure 3.31

Comparaison de la stabilité des capteurs en fonctionnement intermittent (12 h dans du tampon de travail à 25°C, sous agitation et 12 h dans du tampon de stockage à 4°C, en absence d'agitation) et en fonctionnement continu (à 25°C).

(a) PALL™ (b) Nylon™ (c) Copolymère.

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.30.

Les capteurs sont rincés et replacés dans du milieu tampon frais. Comme on le constate, les membranes en toile de Nylon™ montrent une stabilité bien meilleure que celle obtenue par les deux autres méthodes. En effet, elles retiennent 90 % de l'activité initiale même après 250 heures. Par ailleurs, une perte rapide de l'activité enzymatique est notée comme précédemment avec les membranes PALL™. Elle est due probablement aux liaisons non-covalentes de l'enzyme. Avec le système copolymère, les problèmes liés à une mauvaise adhérence et au craquelage de la membrane limitent la durée de vie utile du capteur.

La stabilité des capteurs utilisés de façon intermittente, est déterminée en les plaçant à 25°C en milieu tampon agité pendant 12 heures puis en milieu tampon non-agité à 4°C, pendant les 12 heures suivantes. Les résultats de l'étude de ces deux sortes de stabilités, en continu et en intermittence, pour les 3 types de biocapteurs, sont présentés dans les Figures 3.31 (a - c). Les deux types de membranes (toile de Nylon™ et copolymère), présentent de meilleures stabilités, lorsqu'elles sont utilisées en continu, à la même température (25°C). Cette performance est due, sans doute, au maintien de la température constante. Mais pour les membranes PALL™, le phénomène est opposé. Ceci est probablement dû aux faibles capacités de désorption de l'enzyme à faible température et dans des conditions non-agitées.

La stabilité pendant le stockage, par rapport à la stabilité en cours de fonctionnement, représente la capacité de ces enzymes à restaurer leur propre activité dans des conditions spécifiques de stockage. Nous observons que, contrairement à leur stabilité en solution, les membranes enzymatiques avec toile de Nylon™ et membranes PALL™, ne montrent pas de perte d'activité enzymatique même après une période de 3 ans, lorsqu'elles sont stockées au sec et à 4°C. Cependant, cela n'est plus vrai avec les électrodes à copolymère car le gel a tendance à sécher et à se craqueler.

3.2.3.7 Coût de l'immobilisation

Une étude comparative du coût des différentes techniques d'immobilisation (en considérant essentiellement le coût du travail et du matériel) indique que les membranes en toile de Nylon™ sont les moins chères, alors que les membranes de copolymère sont les plus chères. Le coût élevé des électrodes à membrane de copolymère est dû au travail qualifié requis pour la préparation du copolymère et à la nécessité de nombreux réactifs chimiques.

Conclusions

- Le principal avantage des membranes en toile de Nylon™ et des membranes PALL™ est la possibilité de les préparer en série et d'obtenir ainsi une meilleure reproductibilité des capteurs utilisant ces membranes. De plus, les méthodes d'immobilisation, dans ce cas, sont simples, rapides et requièrent moins de minutie et de temps de préparation que la membrane de copolymère.

- Il n'y a pas de différences significatives de sensibilité et de limite de détection entre les différentes méthodes d'immobilisation pour le dosage des insecticides, sauf pour le système du gel de copolymère qui montre une limite de détection pour le Paraoxon 7 fois plus faible que les deux autres systèmes.

- Les limites de détection des insecticides, en utilisant les 3 systèmes d'immobilisation varient de 0,11 μM à 50 μM .

- Les membranes enzymatiques en toile de NylonTM et surtout PALLTM n'ont pas une durée de vie importante en solution. Par contre, à sec et à 4°C, elles possèdent une très bonne stabilité pendant au moins 3 ans. Cette stabilité particulièrement longue, et l'homogénéité des lots, permet la préparation en série d'un grand nombre de membranes et assure une excellente reproductibilité des dosages.

- En ce qui concerne le coût de l'immobilisation suivant les 3 méthodes différentes, il existe un rapport de 1 à 3, entre les membranes en toile de NylonTM, les moins chères, et celles en copolymère, les plus coûteuses.

- Le Tableau 3.4 résume les caractéristiques essentielles des capteurs utilisant les 3 différentes techniques d'immobilisation.

Technique d'immobilisation	Membrane PALL TM	Membrane en Nylon TM	Membrane en copolymère
Quantité d'enzyme au départ (UI)	4	4	4
Epaisseur de la membrane (μm)	140	80	50
Temps de préparation (h)	1	1	2
Stabilité (h) en fonctionnement continu (jusqu'à 10 % de perte d'activité enzymatique initiale à 25°C)	25	>250	75
Rapport de coût	2	1	3

Tableau 3.4 Comparaison des caractéristiques de capteurs basés sur 3 techniques différentes d'immobilisation d'enzyme.

- Donc en raison de leur stabilité, de leur temps de préparation et de leur coût, les membranes en NylonTM peuvent être considérées comme les plus adaptées pour ce type de dosage.

3.2.4 BIOCAPTEUR A HYDRAZIDE DU COPOLYMERE D'ACRYLAMIDE ET DE METHACRYLAMIDE CHARGE PAR DE L'UREASE

3.2.4.1 Préparation du biocapteur à uréase

Dans le § 2.3.5.5, nous précisons, d'une part, la construction de l'électrode sélective à ammonium à nonactine et, d'autre part, la préparation de ce capteur avec l'uréase (mélange du copolymère et revêtement de l'électrode).

3.2.4.2 Conditions opératoires pour le dosage des ions ammonium et l'analyse de l'urée

Les conditions opératoires choisies sont les suivantes :

Type de tampon et force ionique	: tampon Tris 100 mM à pH 7,4
Electrode de référence	: ECS contenant du tampon Tris 100 mM à pH 7,4 (de façon à éliminer toute interférence due au potassium)
Volume de travail	: 10 ml
Température	: 25°C

3.2.4.3 Réponse aux ions ammonium

L'électrode à ammonium à nonactine subissant les interférences des ions Na^+ et K^+ , ses performances pour le dosage des ions NH_4^+ sont étudiées en présence d'ions Na^+ et K^+ . Les concentrations habituelles des ions Na^+ et K^+ dans le sérum humain varient, respectivement, de 135 à 155 mM et de 3,6 à 5,5 mM. La Figure 3.32 montre les courbes d'étalonnage des ions NH_4^+ en présence et en absence d'ions Na^+ et K^+ . En présence de 15 mM d'ions Na^+ et 0,5 mM d'ions K^+ , une interférence importante est enregistrée pour des faibles concentrations en ions NH_4^+ (en dessous de 1 mM). Puis l'interférence se réduit progressivement pour des concentrations plus élevées en ions NH_4^+ . La linéarité de la courbe, en l'absence d'ions interférents, est plus étendue que celle de la courbe obtenue en présence d'ions interférents : dans le premier cas, elle s'étend sur deux décades. Cette observation est aussi rapportée par d'autres auteurs [13]. De toute façon, au cours d'un dosage, les concentrations à mesurer, peuvent toujours être ramenées dans la plage de linéarité.

3.2.4.4 Réponse à l'urée

La Figure 3.33 présente les courbes d'étalonnage de l'urée, déterminées avec le biocapteur, en présence et en absence d'ions Na^+ et K^+ . Ces courbes sont relativement identiques à

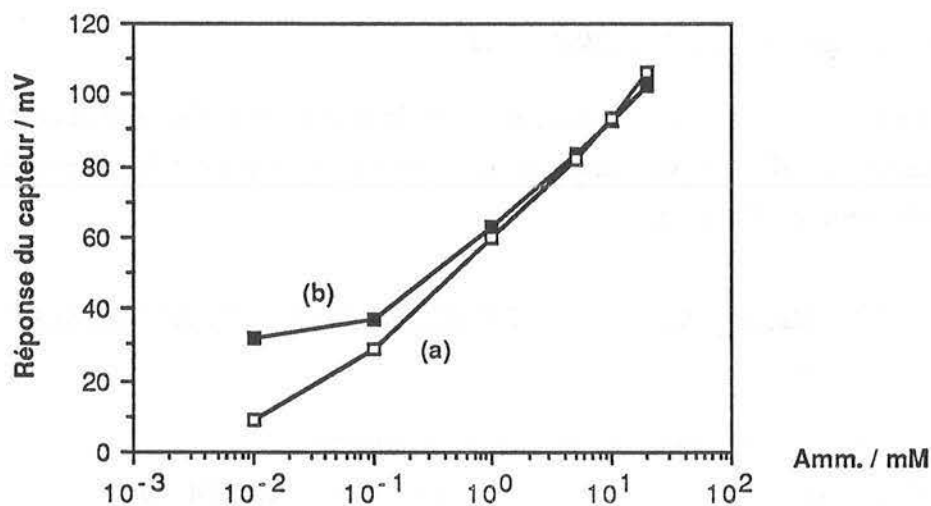


Figure 3.32

Courbes d'étalonnage des ions ammonium obtenues avec l'électrode à nonactine (a) en absence et (b) en présence de Na^+ 15 mM et de K^+ 0,5 mM.

Conditions opératoires : Tampon : Tris-HCl 0,1 M à pH 7,4.
Volume de travail : 10 ml.
Température : 25°C.

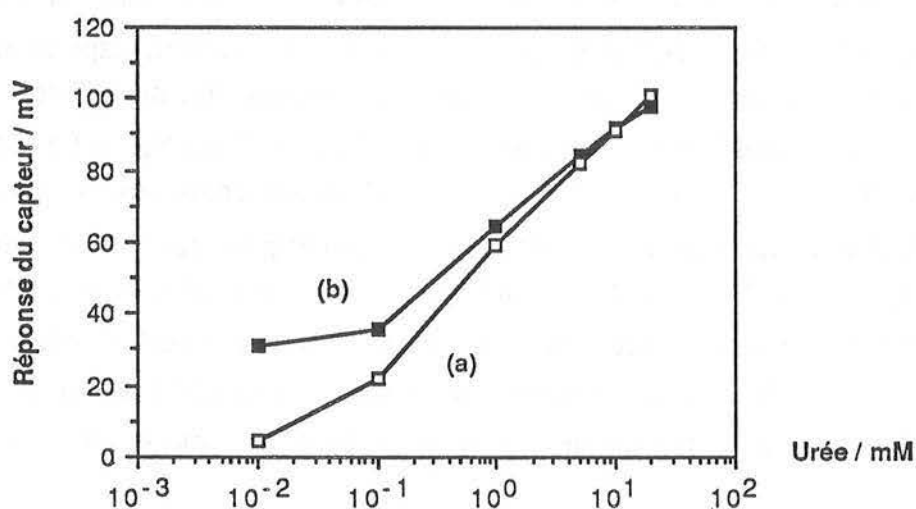


Figure 3.33

Courbes d'étalonnage de l'urée obtenues avec l'électrode à nonactine (a) en absence et (b) en présence de Na^+ 15 mM et de K^+ 0,5 mM.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.32.

celles obtenues pour le dosage des ions NH_4^+ . La linéarité de la courbe en l'absence d'ions interférents est supérieure à celle obtenue en présence de ces mêmes ions.

La Figure 3.34 montre, sur le même diagramme, les courbes d'étalonnage de l'ammonium et de l'urée. Ces deux courbes sont pratiquement superposées, bien que, théoriquement, la courbe de l'urée devrait se trouver à des potentiels plus élevés puisqu'une mole d'urée s'hydrolyse en deux moles de NH_4^+ . Un tel phénomène peut s'expliquer par une transformation incomplète de l'urée selon le pH de travail [76].

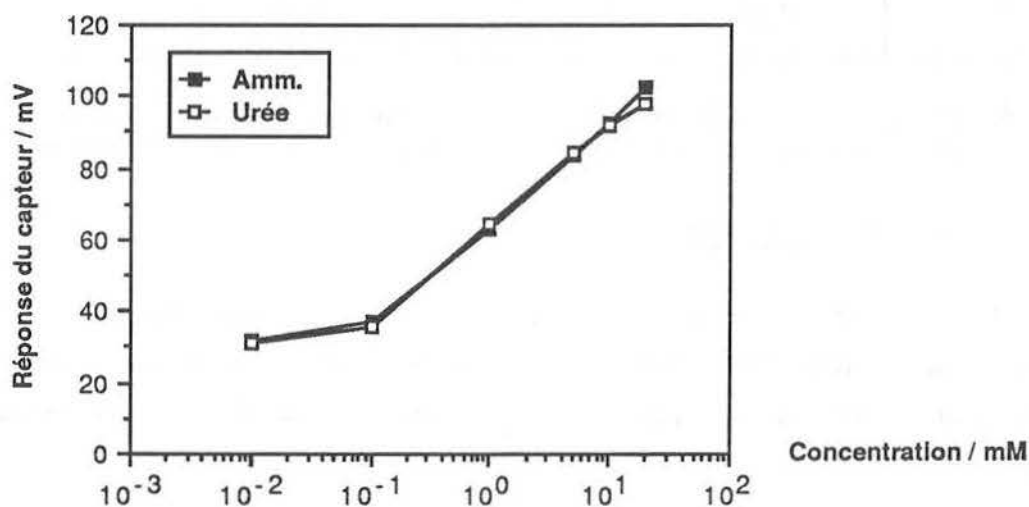


Figure 3.34 Courbes d'étalonnage du biocapteur en fonction de la concentration des ions ammonium et de l'urée en présence des ions interférents (Na^+ et K^+), obtenues à partir des Figures 3.32 et 3.33.

3.2.4.5 Dosage de l'urée dans des échantillons de sérum humain

Au cours du temps, l'urée contenue dans le sérum humain se dégrade, par autohydrolyse, avec formation d'ions NH_4^+ . Aussi, nous utilisons toujours des échantillons récents, de telle sorte que les ions ammonium mesurés soient issus principalement de la réaction enzymatique.

A partir de 1 ml de différents échantillons de sérum humain frais, on dilue 10 fois avec 9 ml de tampon de travail. On obtient ainsi une gamme de concentrations de l'urée de 0,5 à 0,9 mM, qui correspond à la partie linéaire de la courbe d'étalonnage. La concentration en ammonium de l'échantillon est d'abord mesurée avec l'électrode à nonactine, puis avec l'électrode recouverte d'enzyme. La concentration réelle de l'échantillon est ensuite calculée par différence.

Le Tableau 3.5 montre la corrélation entre les mesures effectuées, d'une part, par le biocapteur à uréase, et d'autre part, par la méthode spectrophotométrique clinique (kit enzymatique U.V. Boehringer®), normalement utilisée pour le dosage de l'urée dans le sérum. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont tout à fait comparables.

Ech. de sérum	Ammonium / mM	Urée ^a / mM	Urée ^b / mM	Erreur relative / %
1	0,11	7,04	7,16	2
2	0,33	8,84	9,16	4
3	0,5	7,41	7,49	1
4	0,61	5,08	5,16	2
5	0,38	4,82	4,99	3

Tableau 3.5 Comparaison des résultats obtenus avec le biocapteur à uréase (a) et un kit enzymatique (b), pour le dosage de l'urée dans 5 échantillons de sérum humain.

3.2.4.6 Temps de réponse

Les temps de réponse lors des modifications de concentrations en ions ammonium, par ajouts successifs, sont très courts, en général, de 5 à 10 secondes. Les temps de réponse de ces biocapteurs pour la mesure de l'urée dans des échantillons de sérum se situent entre 30 à 50 secondes.

3.2.4.7 Stabilité du biocapteur

Les biocapteurs ont une stabilité relativement bonne (>30 jours), lorsqu'ils sont stockés à 4°C. Au cours de cette période, ils ont perdu environ 20 % de leur activité enzymatique initiale.

Conclusions

- Un biocapteur pour le dosage de l'urée dans les échantillons de sérum humain, est réalisé en utilisant une électrode sélective à ammonium à nonactine revêtue d'un hydrazide du copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide contenant l'uréase.

- La performance du biocapteur est étudiée en présence de 15 mM d'ions Na⁺ et 0,5 mM d'ions K⁺, concentrations généralement présentes dans les échantillons de sérum humain et qui, normalement, provoquent une interférence avec ce type d'électrode à nonactine.

- L'urée contenue dans 5 échantillons de sérum est dosée en utilisant le biocapteur et par la méthode spectrophotométrique du dosage clinique. Les résultats obtenus, dans les deux cas, sont comparables.

- La réponse du biocapteur à uréase est de 30 à 50 secondes.

- Le biocapteur est stable pendant plus de 30 jours lorsqu'il est stocké à 4°C. Au cours de cette période, il perd environ 20 % de son activité initiale.

3.2.5 NOUVELLE TECHNIQUE D'IMMOBILISATION D'ENZYMES POUR LA MISE AU POINT D'ELECTRODES DE VERRE ENZYMATIQUES A REPONSE RAPIDE

Maintes équipes ont étudié de nombreuses méthodes d'immobilisation de composés biologiques sur différents supports. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients et plusieurs facteurs sont à considérer avant d'adopter l'une de ces techniques.

Un travail considérable a été fait concernant les immobilisations d'enzymes sur les électrodes, par exemple les électrodes de pH, les électrodes à pNH_3 et les électrodes à pO_2 , soit directement sur l'électrode [15, 26, 35, 77-78], soit à proximité immédiate [24, 36, 79-81]. Mais le temps de réponse de la plupart de ces électrodes enzymatiques est de 1 à 5 minutes, voire 10 minutes, le meilleur temps de réponse obtenu étant, jusqu'à présent, de 25 à 30 secondes. Ces temps de réponse très longs sont dus, sans doute, à l'épaisseur excessive de la membrane enzymatique en contact avec l'interface de verre de l'électrode. Ils limitent, évidemment, l'utilisation de tels capteurs dans les applications qui demandent une réponse rapide pour l'information analytique, par exemple l'activation d'un système d'alarme.

3.2.5.1 Préparation des biocapteurs

La technique d'immobilisation de l'enzyme est décrite dans le § 2.3.5.6. La nouveauté de cette méthode réside dans le procédé de dépôt de l'agent réticulant qui est vaporisé sur une couche d'enzyme adsorbée [82-84].

3.2.5.2 Epaisseur de la membrane enzymatique

Au départ, nous immobilisons les enzymes selon une méthode utilisée précédemment dans notre laboratoire. Nous opérons par dépôt d'un mélange d'enzyme, d'ASH et de glutaraldéhyde, et par homogénéisation directe sur l'extrémité sensible de l'électrode de verre. La Figure 3.35 montre cette couche qui a une épaisseur de 14 μm , environ. La littérature [85] mentionne un temps de réponse d'environ 2 à 2,5 minutes pour une électrode à uréase préparée selon cette technique. Ce temps relativement long nous a conduit à rechercher une autre méthode d'immobilisation.

Les électrodes enzymatiques préparées selon notre nouvelle technique montrent une répartition homogène de l'enzyme (Figure 3.36) et de l'enzyme réticulée avec le glutaraldéhyde après vaporisation (Figure 3.37). Cette technique entraîne la formation d'un film extrêmement fin d'enzyme réticulée. Par observation en microscopie électronique des sections de films réticulés sur la surface de l'électrode (Figure 3.38), nous pouvons situer l'épaisseur de ces films entre 1-2 μm .

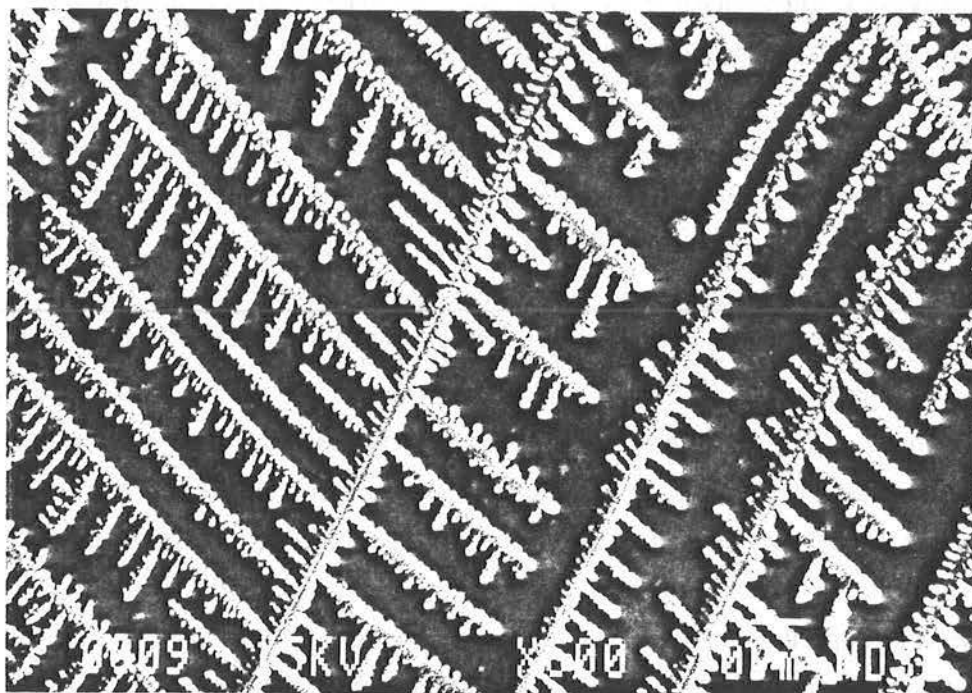


Figure 3.35 AChE déposée sur la surface de l'électrode (vue au microscope électronique avant vaporisation de glutaraldéhyde). Grossissement : x 600.

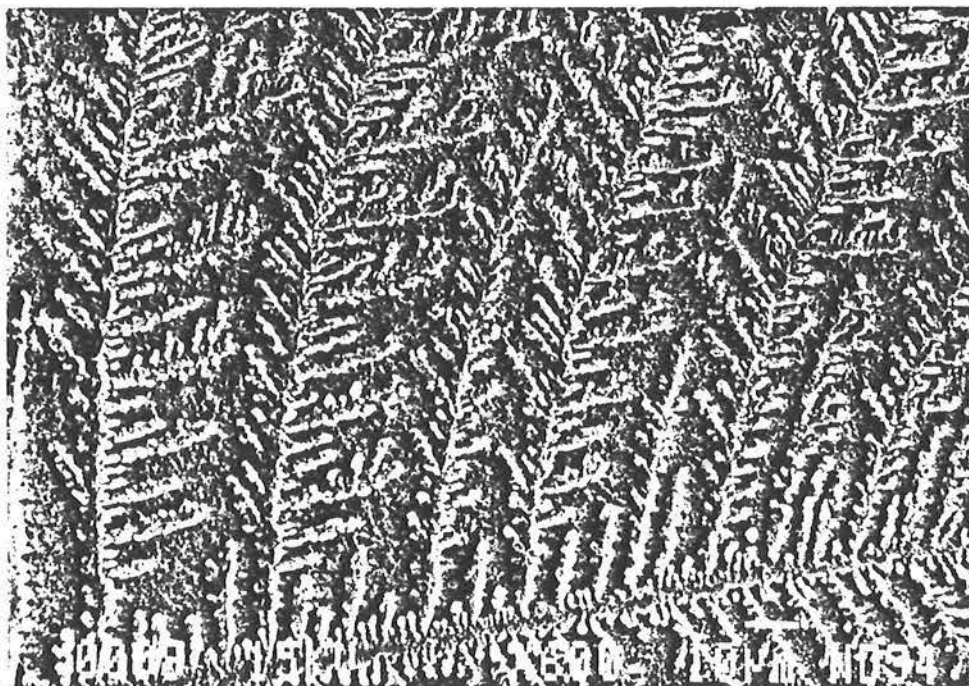


Figure 3.36 AChE déposée sur la surface de l'électrode (vue au microscope électronique après vaporisation de glutaraldéhyde). Grossissement : x 600.

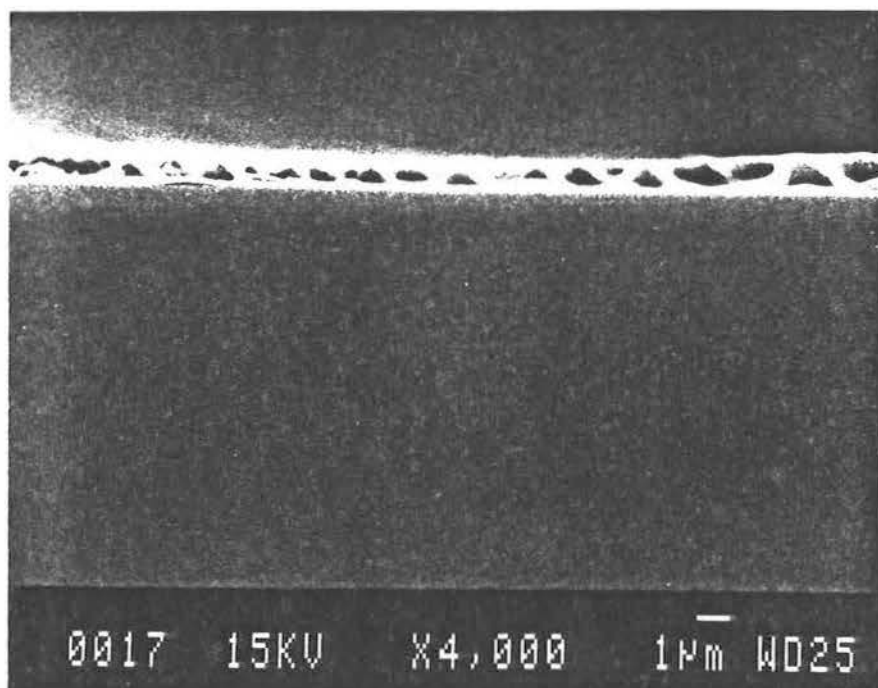


Figure 3.37

Coupe d'une couche de pénicillinase immobilisée à la surface d'une électrode (vue au microscope électronique). Grossissement : x 4000.

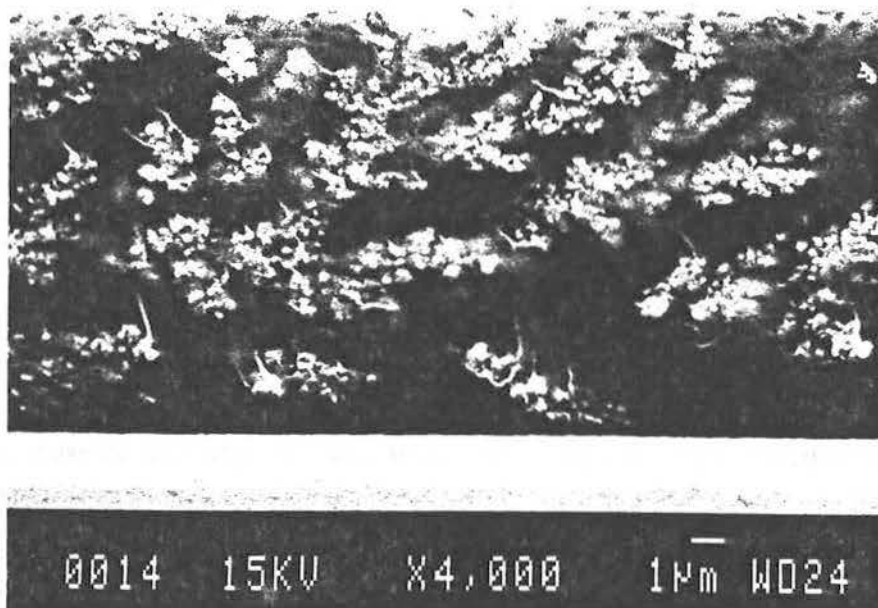


Figure 3.38

Coupe d'une couche de pénicillinase immobilisée par dépôt d'un mélange d'enzyme, d'ASH et de glutaraldéhyde sur la surface de l'électrode (vue au microscope électronique). Grossissement : x 4000.

3.2.5.3 Temps de réponse

Les temps de réponse du biocapteur sont de l'ordre de 5 à 10 secondes, pour des concentrations de substrat qui appartiennent à la partie linéaire des gammes d'étalonnage. Ils sont les plus courts parmi tous ceux mentionnés jusqu'à présent dans la littérature, comme le montre le Tableau 3.6. La Figure 3.39 présente une réponse caractéristique du biocapteur à AChE, après une addition de 1,5 mM d'ACh. Ces temps de réponse très courts ne peuvent qu'être attribués à l'extrême minceur du film d'enzyme immobilisée, que nous déposons par cette technique d'une manière très reproductible.

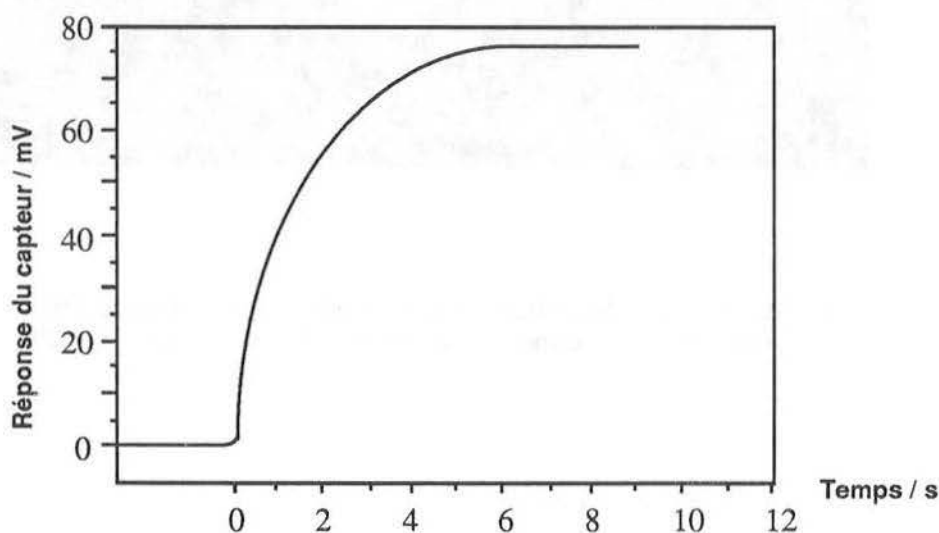


Figure 3.39 Réponse caractéristique du biocapteur à AChE à une concentration d'ACh 1,5 mM.

Conditions opératoires : Tampon : HEPES 2,5 mM à pH 7,3.
 Volume de travail : 25ml.
 Température : 25°C.

3.2.5.4 Réversibilité du biocapteur

Il présente une très bonne réversibilité sans effet de transfert d'échantillon ou de mémoire membranaire. Après chaque mesure, le retour à la ligne de base est toujours instantané.

3.2.5.5 Dosage des substrats (ACh, BuCh, pénicilline-V et urée)

Les Figures 3.40 et 3.41 montrent les courbes d'étalonnage obtenues avec les différentes électrodes enzymatiques, pour leur substrat respectif, dans les conditions opératoires précisées sous chaque schéma. Pour les biocapteurs à AChE et à BuChE, la gamme de mesures s'étend de 0,2 mM à 2 mM et à 1,6 mM, respectivement ; pour l'électrode à pénicillinase de 0,5 mM à 1,8 mM et pour l'électrode à uréase de 0,5 mM à 10 mM. Pour tous ces capteurs, une

Enzyme	Substrat	Technique d'immobilisation	Electrode	Temps de réponse (min)	Linéarité	Référence
Glucose déshydrogénase	Glucose	Enz + ASB + glutarald.	pO ₂	3 à 5	0 à 0,8.10 ⁻³ M	79
Lactate oxydase & Lactate déshyd.	L - Lactate	Enz + polyester	pO ₂	10 à 15	5.10 ⁻⁹ à 5.10 ⁻⁷ M	24
Uréase	Urée	Enz + copolymère d' acryl.méthacryl.	pH	3 à 5	2.10 ⁻⁵ à 3.10 ⁻⁴ M	15
AChE	ACh	Enz + ASB + glutarald.	pH	0,5 à 1	1.10 ⁻⁴ à 1.10 ⁻² M	35
AChE	ACh	Enz + glutaraldehyde	pH	1	1.10 ⁻⁴ à 3.10 ⁻³ M	77
BuChE	BuCh	Enz + ASH + glutarald.	pH	3 à 7	5.10 ⁻⁴ à 1.10 ⁻² M	36
Pénicillinease	Pénicilline-G	Enz + copolymère d' acryl.méthacryl.	pH	2 à 3	4.10 ⁻⁵ à 1.10 ⁻³ M	15
Pénicillinease	Pénicilline-V	Enz + disque en verre fritté	pH	1 à 20	1.10 ⁻⁵ à 3.10 ⁻³ M	80
Carboxy peptidase A + L-aspartase	Aspartame	Enz + ASB + glutarald.	pNH ₃	4 à 8	4,25.10 ⁻⁴ à 8,1.10 ⁻³ M	26
Adénosine désaminase	Adénosine	Enz + ASB + glutarald.	pNH ₃	7 à 12	3,5.10 ⁻⁵ à 1,6.10 ⁻² M	78
COD	Choline	Enz + polyacrylonitrile	pO ₂	1 à 2	0 à 0,14.10 ⁻³ M	81
AChE	ACh	Enz + glut. vaporisé	pH	0,08 à 0,16	2.10 ⁻⁴ à 2.10 ⁻³ M	Notre étude
BuChE	BuCh	Enz + glut. vaporisé	pH	0,08 à 0,16	2.10 ⁻⁴ à 1,6.10 ⁻³ M	Notre étude
Pénicillinease	Pénicilline-V	Enz + glut. vaporisé	pH	0,08 à 0,16	5.10 ⁻⁴ à 1,8.10 ⁻³ M	Notre étude

Tableau 3.6

Comparaison de quelques temps de réponse cités dans la littérature pour des électrodes de pH en verre, de pNH₃ et de pO₂ avec corps en verre.

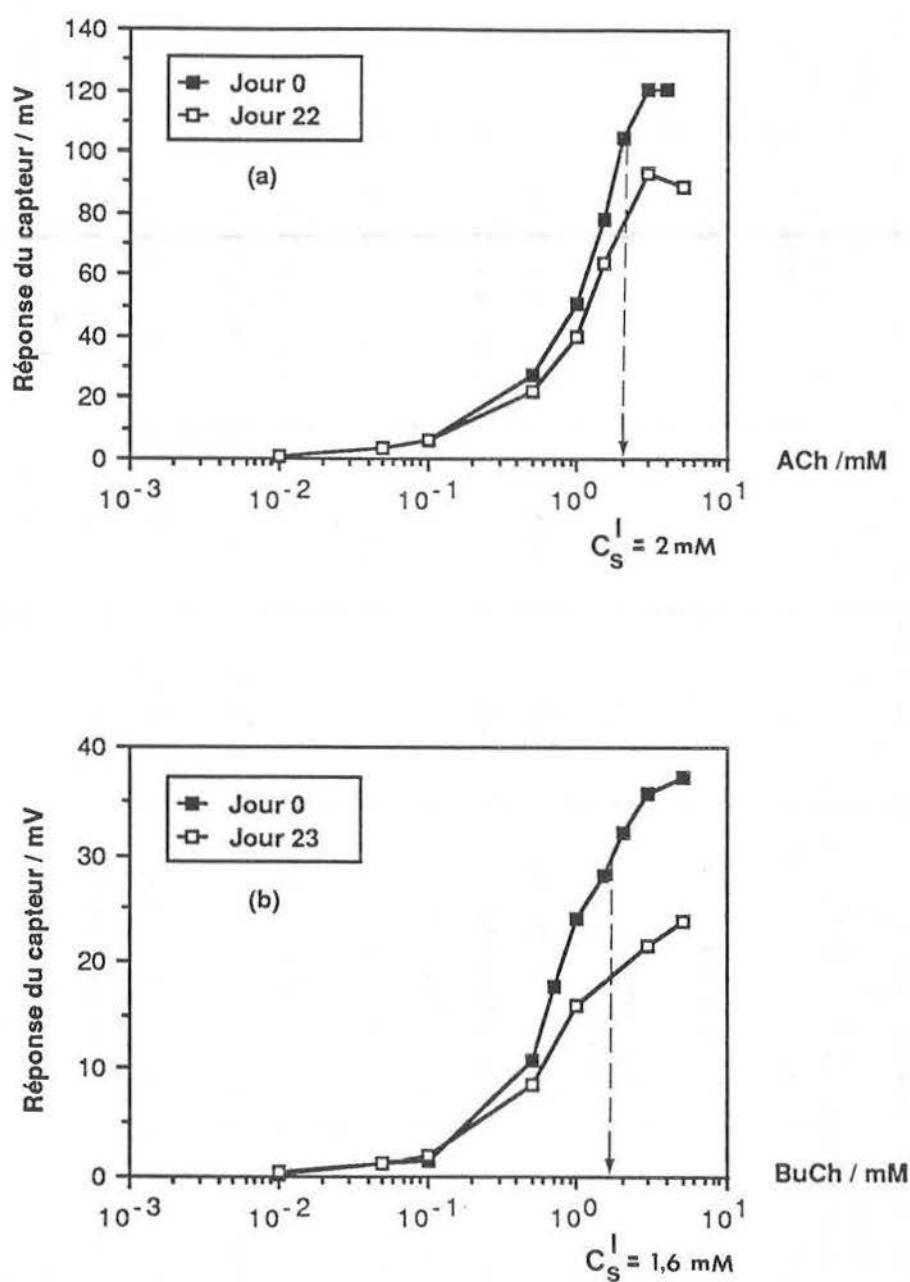


Figure 3.40 Courbes d'étalonnage des biocapteurs (a) à AChE et (b) à BuChE. Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.39.

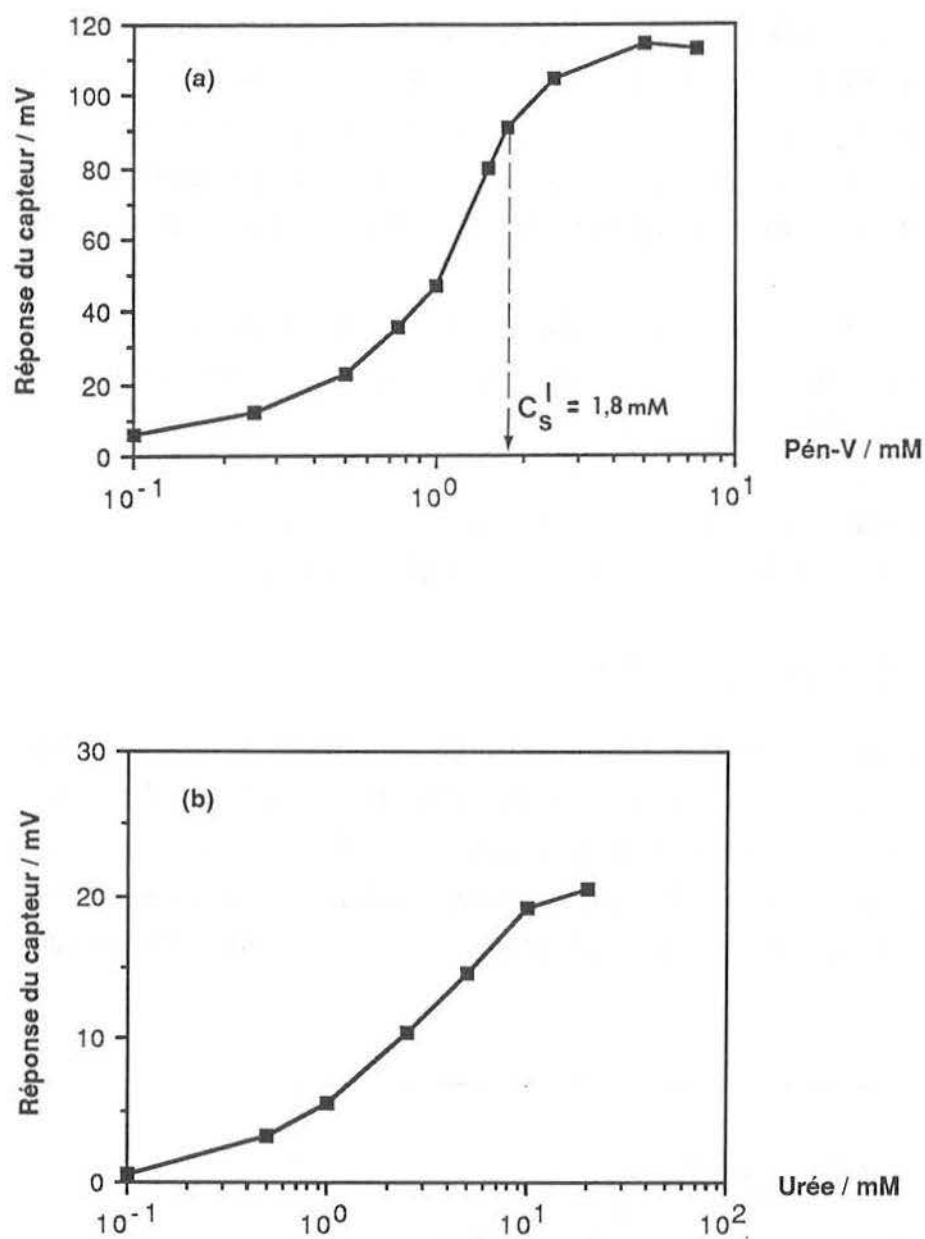


Figure 3.41 Courbes d'étalonnage des biocapteurs (a) à pénicillinase et (b) à uréase.

Conditions opératoires : (courbe a) identiques à celles de la Figure 3.39.

(courbe b) Tampon : Tris-acétate 10 mM à pH 7,0. Autres Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.39.

perte de sensibilité est observée après une certaine période d'utilisation. Au jour zéro, les pentes des parties linéaires des courbes d'étalonnage sont, pour une décade, de 188 mV pour l'AChE, 44 mV pour la BuChE, 47 mV pour la pénicillinase et de 14 mV pour l'uréase.

Théoriquement, les pentes des courbes d'étalonnage, obtenues avec des électrodes potentiométriques pour des substances univalentes, sont Nernstiennes (environ 59 mV/décade de concentration de la substance, à 25°C). Cependant, les électrodes enzymatiques présentent assez souvent un comportement sub- ou super-Nernstien. Ce comportement est dû, probablement, aux raisons suivantes :

- le phénomène autocatalytique dû à l'existence d'un pH optimal
- la dissociation partielle des produits acides ou basiques et leurs propriétés de transport dans la couche enzymatique
- le pH de la solution testée
- la concentration des sels tampon, présents dans la solution
- les coefficients de diffusion des diverses espèces présentes

3.2.5.6 Stabilité du biocapteur

Pour tester la stabilité du biocapteur en fonction du temps, nous appliquons un usage intermédiaire entre stockage et utilisation en continu tels que définis dans le § 3.2.3 6 : la nuit, les capteurs sont laissés à 4°C; le jour, ils sont utilisés à 25°C. La Figure 3.42 montre les réponses des biocapteurs en fonction du temps. A l'exception du capteur à uréase, ils ne montrent aucune perte d'activité enzymatique pendant 12 jours d'utilisation intermittente. Après cette période, une baisse

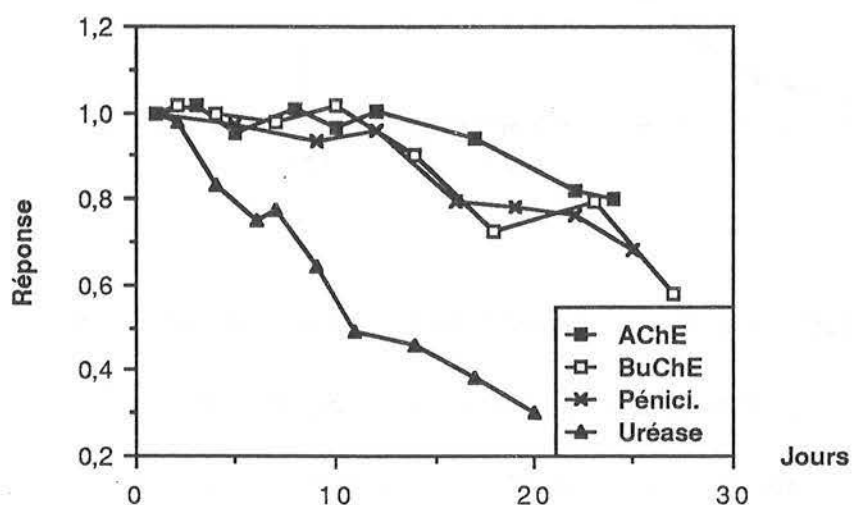


Figure 3.42 Stabilité des différents biocapteurs.

Conditions opératoires identiques à celles des Figures 3.40/41.

graduelle d'activité enzymatique se produit, et, en général, une diminution de l'ordre de 10 % est observée après environ 15 jours d'utilisation. Ce phénomène est dû, probablement, aux deux raisons suivantes :

- la dénaturation de l'enzyme proprement dite
- le relargage de l'enzyme par rupture des liaisons covalentes entre l'enzyme, le glutaraldéhyde et le support.

3.2.5.7 Activité spécifique de l'enzyme utilisée pour l'immobilisation

Avant utilisation, toutes nos solutions enzymatiques sont testées, à la fois pour leur activité enzymatique et leur contenu protéique. Le Tableau 3.7 présente les valeurs de l'activité des solutions enzymatiques utilisées pour nos immobilisations.

D'après nos observations, les solutions contenant les enzymes utilisées pour la préparation des biocapteurs, doivent présenter une forte activité spécifique. En effet, les performances intéressantes de nos électrodes enzymatiques sont obtenues avec des activités spécifiques estimées à au moins 1000 UI.mg⁻¹ de protéine. Quand nous utilisons des solutions enzymatiques à faible activité spécifique, nous observons des revêtements épais, visibles à l'oeil nu, qui s'effritent facilement. Une explication possible de cet écaillage ("peeling-off") peut être la quantité trop importante de protéine adsorbée à la surface de l'électrode formant une réticulation dense avec le glutaraldéhyde. De telles membranes ont ainsi tendance à se détacher elles-mêmes en raison des contraintes dimensionnelles. De plus, ces membranes trop épaisses entraînent une diminution de l'amplitude des signaux à cause de la faible activité spécifique de la solution enzymatique utilisée. Les réponses des biocapteurs à BuChE (Figure 3.43) préparés avec des solutions d'activités spécifiques enzymatiques différentes, illustrent ces observations.

Enzyme	AChE	BuChE	Pénicilline	Urée
UI.ml ⁻¹ dosées	3150	1110	1400	7200
UI.mg ⁻¹ prot. ^a	2620	1180	5000	40
Vol. de la solution /ml	1.0	1.0	0.5	0.5
UI en contact avec l'électrode	3150	1110	700	3600

a teneur en protéine déterminée par la méthode Bio-Rad

Tableau 3.7 Concentrations d'enzymes dans les solutions utilisées pour l'immobilisation.

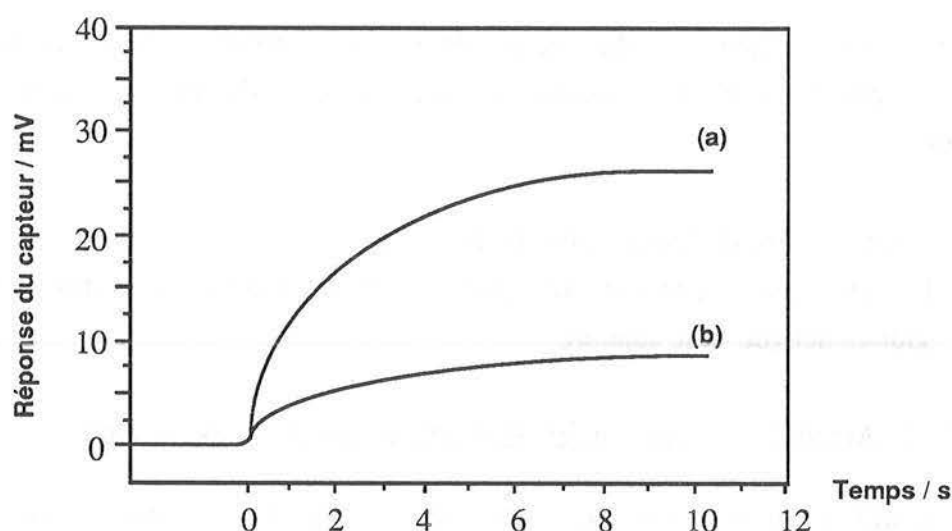


Figure 3.43 Réponse des biocapteurs à BuChE préparés par utilisation de solutions d'enzyme ayant une activité spécifique de (a) 1180 UI.mg⁻¹ protéine et de (b) 5 UI.mg⁻¹ protéine.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 3.39.

L'utilisation du biocapteur à uréase met en évidence le paramètre de l'activité spécifique car, à la différence des cholinestérases et de la pénicillinase, l'uréase n'est pas disponible commercialement avec une activité spécifique aussi élevée. Nous l'avons, donc préparé avec une solution d'uréase qui a une activité spécifique de 40 UI.mg⁻¹ de protéine, ce qui représente, par exemple, 1,5 % de l'activité spécifique de l'AChE. Ceci est sans doute la raison de la diminution du signal et de la stabilité de l'électrode à uréase. Cependant, le temps de réponse de ce biocapteur reste encore comparable aux temps de réponse des autres biocapteurs.

3.2.5.8 Estimation théorique de la quantité d'enzyme immobilisée

La réponse à l'état stationnaire des électrodes potentiométriques enzymatiques a été simulée par certains chercheurs [86] pour évaluer la concentration minimale d'enzyme immobilisée dans les couches. Ceci a été fait à partir de la seconde loi de diffusion de Fick et de la réaction enzymatique obéissant à la cinétique de Michaelis et Menten. L'équation donnant la vitesse de variation de concentration du substrat, quelle que soit la section réticulée X de la membrane enzymatique décrite dans la Figure 3.44, est :

$$\frac{\partial C_S}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2 C_S}{\partial X^2} - \frac{k_2[E]_0 C_S}{K_M + C_S} \quad (1)$$

où, C_S est la concentration du substrat (exprimée en mol.cm⁻³),
 D_S , le coefficient de diffusion du substrat dans la membrane (exprimé en cm².s⁻¹),
 $k_2[E]_0$, l'activité enzymatique (exprimée en mol.s⁻¹.cm⁻³),
 K_M , la constante de Michaelis de la réaction (exprimée en mol.cm⁻³).

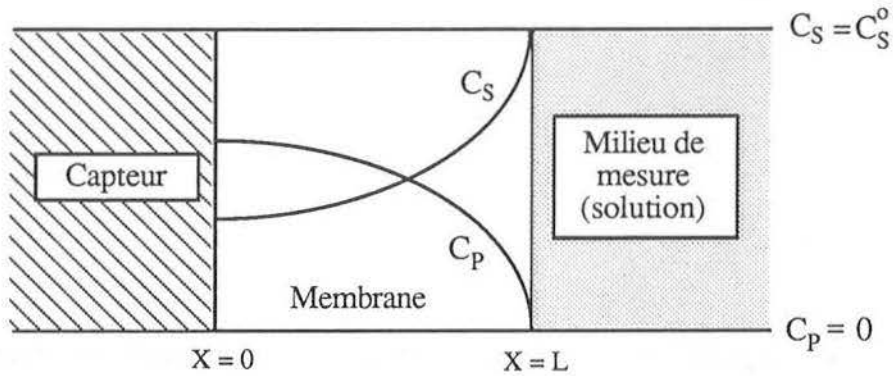


Figure 3.44 Modèle de l'électrode enzymatique :

- couche d'enzyme de $X = 0$ à $X = L$.
- milieu de mesure à partir de $X = L$.
- schéma des profils de concentrations en substrat et en produit
- conditions limites utilisées dans le programme.

A l'état stationnaire, la dérivée par rapport au temps, tend vers zéro et ceci conduit à une équation différentielle ordinaire et non-linéaire du second ordre.

$$\frac{\partial^2 C_S}{\partial X^2} = \frac{k_2[E]_0 C_S}{D_S(K_M + C_S)} \quad (2)$$

pour laquelle, les conditions aux bornes sont les suivantes :

$$\left. \frac{dC_S}{dX} \right|_{X=0} = \left. \frac{dC_P}{dX} \right|_{X=0} = 0 \quad (3)$$

$$C_S \Big|_{X=L} = C_S^0 \text{ (concentration du substrat dans le milieu)} \quad (4)$$

Pour simplifier, les coefficients de diffusion du substrat et du produit, sont considérés égaux et la concentration du produit dans le milieu est prise égale à zéro. Pour réduire l'équation (2) à une forme sans dimension, afin de faire apparaître nettement les facteurs qui influencent la réponse du système, nous effectuons un changement de variables qui conduit aux équations sans dimension ci-dessous. La distance \bar{X} est définie en fonction de l'épaisseur totale de la membrane L (cm), et la concentration \bar{C}_S en fonction de la concentration du substrat dans le milieu C_S^0 (exprimée en mol.cm^{-3}).

$$\bar{X} = X/L, \quad (5)$$

$$\bar{C}_S = C_S/C_S^0 \quad (6)$$

$$\bar{K}_M = K_M/C_S^0 \quad (7)$$

$$\text{et } \alpha = \frac{k_2[E]_0 L^2}{K_M D_S} \quad (8)$$

L'équation (9) présentée ci-dessous résulte de la substitution dans l'équation (2) des équations sans dimension présentées ci-dessus.

$$\frac{\partial^2 \bar{C}_S}{\partial \bar{X}^2} = \frac{\alpha \bar{K}_M \bar{C}_S}{\bar{K}_M + \bar{C}_S} \quad (9)$$

Elle montre que la réponse du système dépend essentiellement de deux facteurs : α , le facteur sans dimension de charge de l'enzyme, caractéristique d'une électrode enzymatique donnée,

\bar{K}_M , qui dépend de l'enzyme utilisée et de la concentration du substrat du milieu.

Nous avons réalisé un programme pour calculer α dans l'équation (9), en utilisant les valeurs expérimentales observées de K_M et C_S^1 . Ce dernier paramètre représente la concentration limite de substrat dans le milieu où la concentration du produit C_P devient indépendante de C_S^0 . Donc, dans ces conditions, l'activité enzymatique de la membrane est maximale. Les valeurs de C_S^1 sont indiquées dans les Figures 3.40 - 41. Les résultats obtenus dans le programme sont présentés en annexe pour l'électrode à AChE.

L'activité enzymatique nécessaire par unité de volume de membrane est ensuite calculée en utilisant la définition de l'activité enzymatique et l'équation (8). On obtient

$$[A] = \frac{\alpha K_M D_S}{L^2} \cdot 6.10^7 \quad (10)$$

où $[A]$ est l'activité enzymatique (exprimée en UI.cm⁻³). La quantité d'enzyme immobilisée sur chaque électrode est déduite de la connaissance du volume de la membrane.

Le Tableau 3.8 résume les résultats obtenus à partir de la simulation mathématique des réponses des électrodes. Le biocapteur à AChE indique 7,7 UI, le biocapteur à BuChE 6,8 UI et le biocapteur à pénicillinase, 7,4 UI.

Enzymes	AChE ^b	BuChE ^c	Pénicilline ^d
α^a	7,4108	5,3057	5,7624
UI immobilisées	7,7	6,8	7,4

a basé sur $L=1,5 \mu\text{m}$, $D_s=10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ c $K_m=1,5 \text{ mM}$, $C_s^1=1,6 \text{ mM}$

b $K_m=1,2 \text{ mM}$, $C_s^1=2 \text{ mM}$ d $K_m=1,5 \text{ mM}$, $C_s^1=1,8 \text{ mM}$
surface de l'électrode = $2,15 \text{ cm}^2$

Tableau 3.8 Quantités d'enzymes immobilisées (en UI) calculées à partir du programme.

Conclusions

- Cette nouvelle technique est simple, peu coûteuse et demande environ 1 heure et 1/2 de préparation pour chaque électrode enzymatique.
- La couche enzymatique extrêmement fine (de l'ordre de 1-2 μm) permet un temps de réponse du capteur très court (5-10 secondes).
- Par cette nouvelle méthode, nous avons immobilisé plusieurs enzymes, telles que l'AChE, la BuChE, la pénicilline et l'urée, sur des électrodes de pH en verre.
- Ces capteurs, en général, perdent seulement 10 % de leur activité initiale, après 15 jours d'utilisation intermittente.
- Les solutions enzymatiques utilisées pour l'immobilisation doivent avoir une activité spécifique élevée (au moins $1000 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine).
- Une simulation mathématique de la réponse de ces capteurs permet une estimation de la quantité d'enzyme immobilisée sur l'électrode. Cette quantité varie entre 6 et 8 UI, ce qui traduit la très forte densité enzymatique, compte tenu de l'épaisseur de la couche.
- Cette nouvelle technique présente des perspectives très intéressantes car elle pourrait s'appliquer à l'immobilisation d'autres substances protéiques en couche très fine sur divers supports. La construction de surface de réaction (en bioréacteurs à flux ou en fermenteurs de type batch) et de biocapteurs avec différents types de transducteurs tels que fibres optiques, métaux traités, fibres et membranes artificielles, sont quelques exemples possibles d'application de cette technique.

CHAPITRE 4

ANALYSE PAR INJECTION EN FLUX CONTINU

(FIA)

4.1 RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

4.1.1 PRINCIPE

L'analyse par injection en flux continu (technique d'analyse maintenant largement développée) est basée sur l'injection d'un échantillon liquide dans un flux porteur continu constitué d'un réactif convenablement choisi. L'échantillon injecté forme une zone qui, durant son transfert vers un détecteur, se disperse et réagit avec les composants du flux porteur. La forme et l'amplitude des pics détectés expriment la concentration de la substance injectée et fournissent des informations cinétiques sur les réactions chimiques se produisant dans le flux continu [87].

Le mode d'injection en flux continu le plus simple et le plus souvent adopté est présenté sur la Figure 4.1.

4.1.2 CARACTERISTIQUES D'UN SYSTEME FIA

Sa caractéristique la plus intéressante est sa reproductibilité. Elle peut être attribuée aux propriétés suivantes du système :

- minutage reproductible
- injection, donc introduction rapide et ponctuelle de l'échantillon
- contrôle de la dispersion de l'échantillon

Ces facteurs contribuent à réduire significativement le temps d'analyse et à supprimer l'attente des états stationnaires avant d'effectuer les mesures. De plus, l'automatisation du système FIA présente les avantages suivants :

- réduction des coûts de main-d'œuvre
- amélioration de l'exactitude et de la précision
- possibilité d'utilisation dans des situations à risques pour l'homme, l'automatisation permettant d'éviter le contact avec les produits toxiques
- réduction du temps d'analyse, donc augmentation de la fréquence d'échantillons dosés

4.1.3 APPLICATIONS

Grâce à ses nombreux avantages (simplicité, rapidité, flexibilité), la FIA est devenue un système analytique très utilisé dans des domaines variés : médecine [88-89], alimentation [90-91], environnement [92-95], analyse de la biomasse [96-97], pharmacie [98-99].

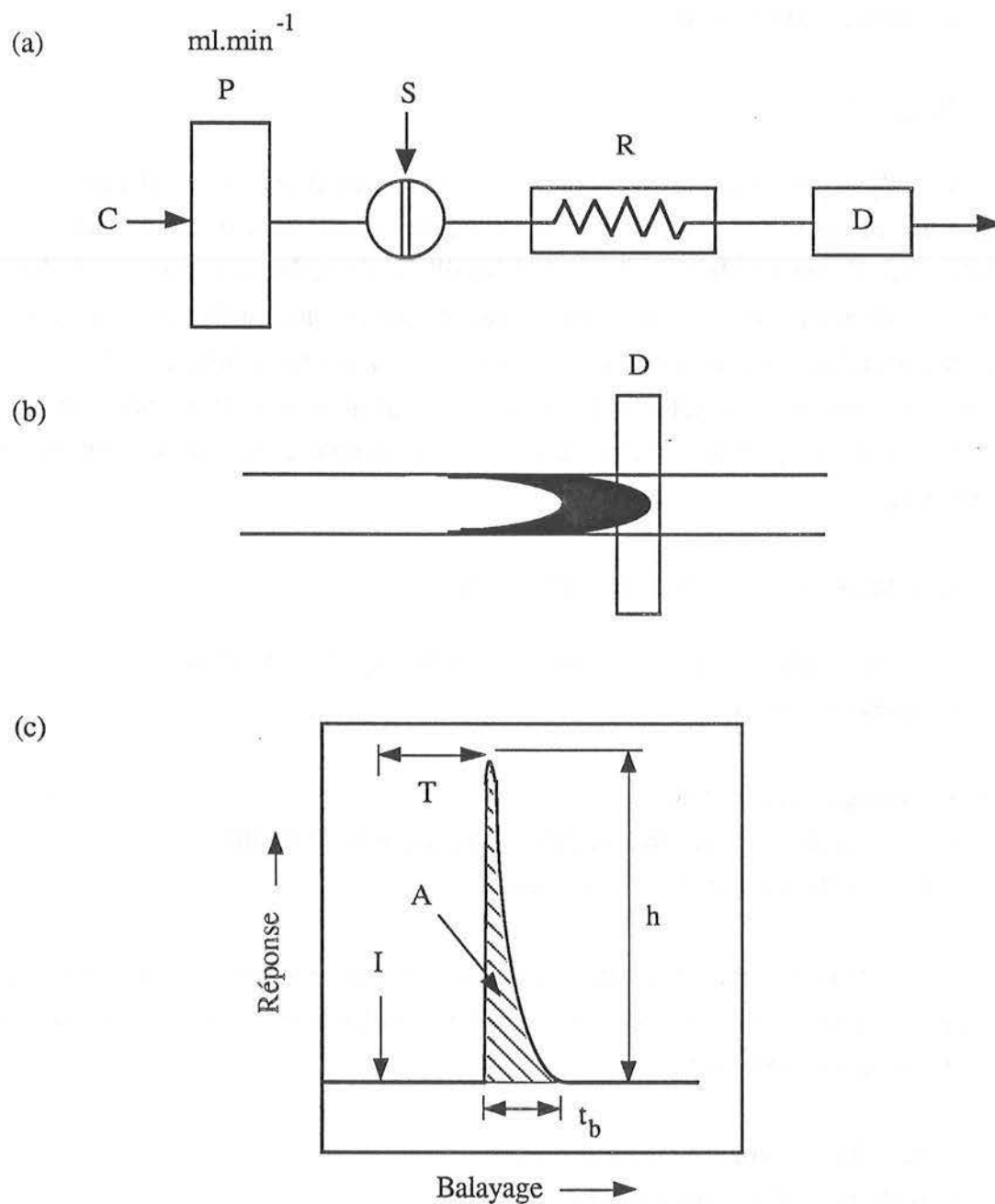


Figure 4.1

- (a) Configuration la plus simple d'un système de FIA à un seul passage : C = flux porteur ; P = pompe ; S = vanne d'injection ; R = réacteur ; D = détecteur. (b) Zone de dispersion de l'échantillon tel qu'il passe à travers le réacteur. (c) Pic caractéristique enregistré sous flux continu ; I = point d'injection de l'échantillon ; T = temps mort ; h = hauteur du pic ; t_b = largeur du pic à la base, A = aire du pic.

4.1.4 DOSAGE DES INHIBITEURS D'ENZYMES PAR FIA

Comme mentionné précédemment, le dosage des inhibiteurs basé sur les méthodes d'inhibition d'enzyme nécessite l'utilisation d'une faible quantité d'enzyme qui ne masque pas l'effet inhibiteur tout en produisant des signaux mesurables. Donc, le système FIA, par l'utilisation de petites quantités d'enzyme et par sa reproductibilité de mesure des variations des activités enzymatiques avant et après inhibition, est tout à fait adapté à ce type de dosage.

4.1.4.1 Dosage des insecticides organophosphorés et des carbamates

Le dosage des pesticides organophosphorés et des carbamates par FIA a déjà été étudié par certains auteurs [100-101]. Dans ce domaine, les études récentes présentent un système pour le dosage des pesticides dans l'eau potable [102], par utilisation de particules magnétiques chargées en AChE, et de la COD immobilisée sur des billes de verre de porosité contrôlée. L'activité enzymatique est suivie, soit par un détecteur photométrique, soit par un détecteur ampérométrique. Un autre système pour le dosage rapide du Paraoxon est décrit [103]. Il emploie l'AChE immobilisée sur des billes de verre de porosité contrôlée et un spectrophotomètre comme détecteur. Il utilise deux méthodes de mesures : le flux continu et le flux arrêté ("stopped-flow"). Les limites de détection plus faibles obtenues avec la méthode par flux arrêté, montrent la lenteur de la cinétique de l'inhibition de l'enzyme.

4.1.4.2 Réactivation de l'enzyme

De nombreuses techniques analytiques pour le dosage des anti-cholinestérases sont proposées. Dans ces méthodes, la réactivation de l'enzyme inhibée présente un avantage indéniable ; elle permet la réutilisation de l'enzyme, donc son utilisation en continu et ainsi augmente l'intérêt pratique de ces systèmes.

Contrairement aux biocapteurs classiques, les systèmes FIA sont plus flexibles. En effet, l'emploi de réacteurs enzymatiques en FIA entraîne la séparation du biorécepteur et du transducteur, ce qui facilite la réactivation de l'enzyme. De plus, la disposition en parallèle des réacteurs favorise l'utilisation de l'enzyme en continu : le réacteur en cours de réactivation est déconnecté du système tandis que le transducteur (détecteur) est connecté à un autre réacteur où l'enzyme est active.

4.1.5 PRESENTATION DE L'ETUDE

Un système manuel pour le dosage des insecticides organophosphorés et des carbamates, basé sur l'inhibition de l'AChE, est présenté dans cette partie. Après avoir optimisé des paramètres opératoires, nous appliquons cette technique à la détection d'insecticides dans une préparation synthétique d'eau de mer, car les retombées chimiques accidentelles pendant le

transfert maritime posent actuellement de graves problèmes. L'AChE, après avoir subi une inhibition supérieure à 88 %, est réactivée avec une solution diluée de 2-PAM et peut ainsi être réutilisée pour une analyse ultérieure.

4.2 MATERIELS ET METHODES

Les matériels suivants utilisés sont ceux déjà précisés dans le chapitre 2 :

AChE, AChCl, HEPES, $MgCl_2$, NaCl, gélatine, glutaraldéhyde, éthanol, 2-PAM, TNBS et eau de brome.

Le tampon de travail est du tampon HEPES 2,5 mM, contenant 20 mM de $MgCl_2$, 100 mM de NaCl et 0,01 % (m/v) de gélatine pour stabiliser l'enzyme.

Les billes de verre ($\phi = 0,5$ à $0,75$ mm) sur lesquelles l'AChE est immobilisée sont fournies par Bioblock® Scientific (France), alors que les tubes de verre ($\phi_{int} = 1,1$ mm), dans lesquels les billes sont insérées (Figure 4.2) proviennent de Corning® France.

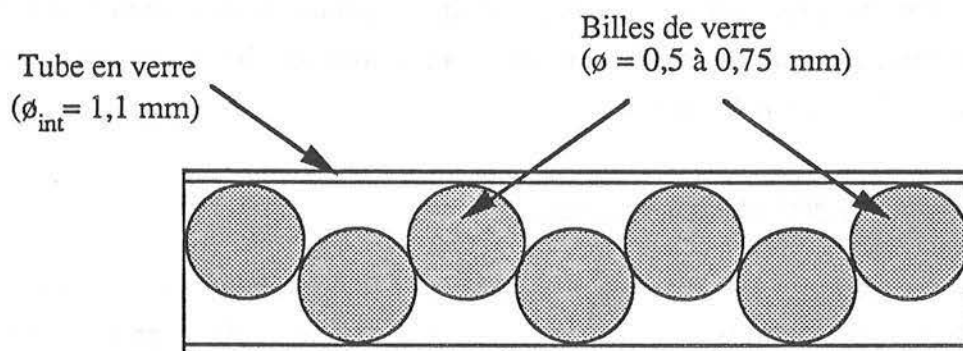


Figure 4.2 Réacteur tubulaire à une rangée de billes.

Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTS) utilisé pour l'immobilisation de l'AChE sur les billes de verre est fourni par Sigma® Chemical.

Les insecticides utilisés dans les tests sont des produits PESTANAL®, fournis par Riedel-de Haën®, AG, D-3016, Seelze 1, Allemagne.

Ethyl Azinphos	M.M. = 345,38 g.mol ⁻¹
Méthyl Azinphos	M.M. = 317,33 g.mol ⁻¹
Méthyl Bromophos	M.M. = 366, 00 g.mol ⁻¹
Dichlorovos.....	M.M. = 220,98 g.mol ⁻¹
Fenitrothion.....	M.M. = 277,24 g.mol ⁻¹
Malathion.....	M.M. = 330,36 g.mol ⁻¹

Paraaxon.....	M.M. = 275,20 g.mol ⁻¹
Ethyl Parathion	M.M. = 291,26 g.mol ⁻¹
Méthyl Parathion	M.M. = 263,21 g.mol ⁻¹
Carbaryle.....	M.M. = 201,22 g.mol ⁻¹
Carbofurane.....	M.M. = 221,26 g.mol ⁻¹

L'eau de mer synthétique est préparée à partir de sel pour artémie et phytoplancton, normalement utilisé pour les préparations d'eau de mer synthétique pour les aquariums de poissons. 32 g de sel sont dissous dans 1 litre de solution. Pour maintenir la croissance d'artémie et de phytoplancton, l'eau est continuellement aérée et exposée à la lumière solaire. Son pH est d'environ 8.

4.2.1 IMMOBILISATION D'ENZYME

La méthode d'immobilisation adoptée est identique à celle décrite précédemment [104] pour l'immobilisation de la pénicillinase sur les billes de verre.

3 g de billes de verre sont lavés successivement par une solution d'acide chlorhydrique 10^{-2} M, de l'eau distillée et une solution de soude 10^{-2} M. Cette série de lavages est répétée 3 fois afin que les billes soient propres et ne présentent aucune matière adsorbée. Après séchage à 100°C , nous les introduisons dans une solution contenant 27 ml d'éthanol à 95° et 3 ml d'APTS, pour les silaniser. L'ensemble est dégazé sous vide, puis placé sous agitation pendant deux minutes. Les billes sont ensuite isolées par décantation et lavées par 10 ml d'éthanol à 95° . Puis, elles sont séchées à 110°C pendant 10 minutes.

Nous effectuons alors le couplage avec le glutaraldéhyde : les billes silanisées sont placées sous agitation pendant 1 heure dans 10 ml d'une solution à 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate de sodium 5.10^{-2} M à pH 7,0. Après séparation par décantation, elles sont lavées une dizaine de fois avec de l'eau distillée pour éliminer le glutaraldéhyde en excès. Ensuite, elles sont laissées dans 20 ml de tampon phosphate 5.10^{-2} M à pH 7,0., pendant 15 minutes à 4°C .

Nous réalisons alors le couplage avec l'enzyme : après séparation par décantation, les billes sont immergées toute une nuit (12 h) à 4°C dans 2 ml d'une solution de tampon phosphate de sodium 5.10^{-2} M à pH 7,0, contenant approximativement 350 UI d'AChE. Après décantation, les billes sont lavées successivement avec de l'eau distillée et une solution de KCl, 1 M, pour éliminer l'enzyme non liée.

Enfin, elles sont stockées à 4°C dans le tampon de travail, jusqu'à leur utilisation. La Figure 4.3 présente les réactions intervenant dans l'activation des billes et l'immobilisation de l'enzyme.

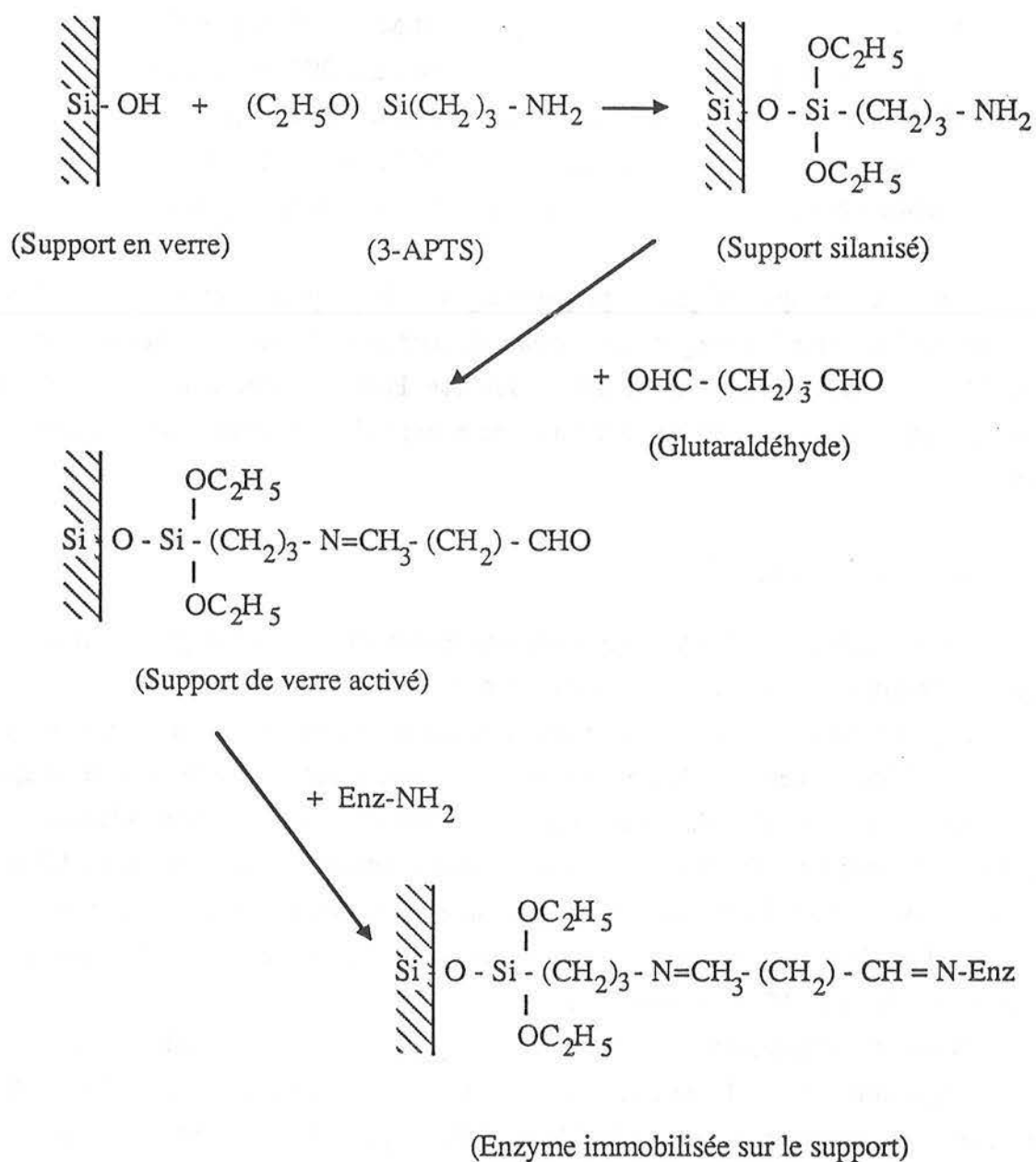


Figure 4.3 Silanisation des billes de verre suivie de l'immobilisation de l'enzyme.

4.2.2 DOSAGE DES GROUPEMENTS AMINES

La quantité des groupements NH_2 présents sur les billes de verre, avant le couplage avec le glutaraldéhyde, est mesurée par traitement des billes avec une solution saturée de tétraborate de sodium contenant 0,1 % (v/v) d'acide trinitrobenzènesulfonique [105]. La formation de trinitrobenzènesulfonate d'ammonium (Figure 4.4) est suivie par spectrophotométrie à 419 nm.

Nos dosages portant sur 10 lots différents de billes, ont donné $32 \pm 4 \mu\text{mol}$ de NH_2 par gramme de billes. Ces résultats montrent la reproductibilité de notre système d'activation du support en verre.

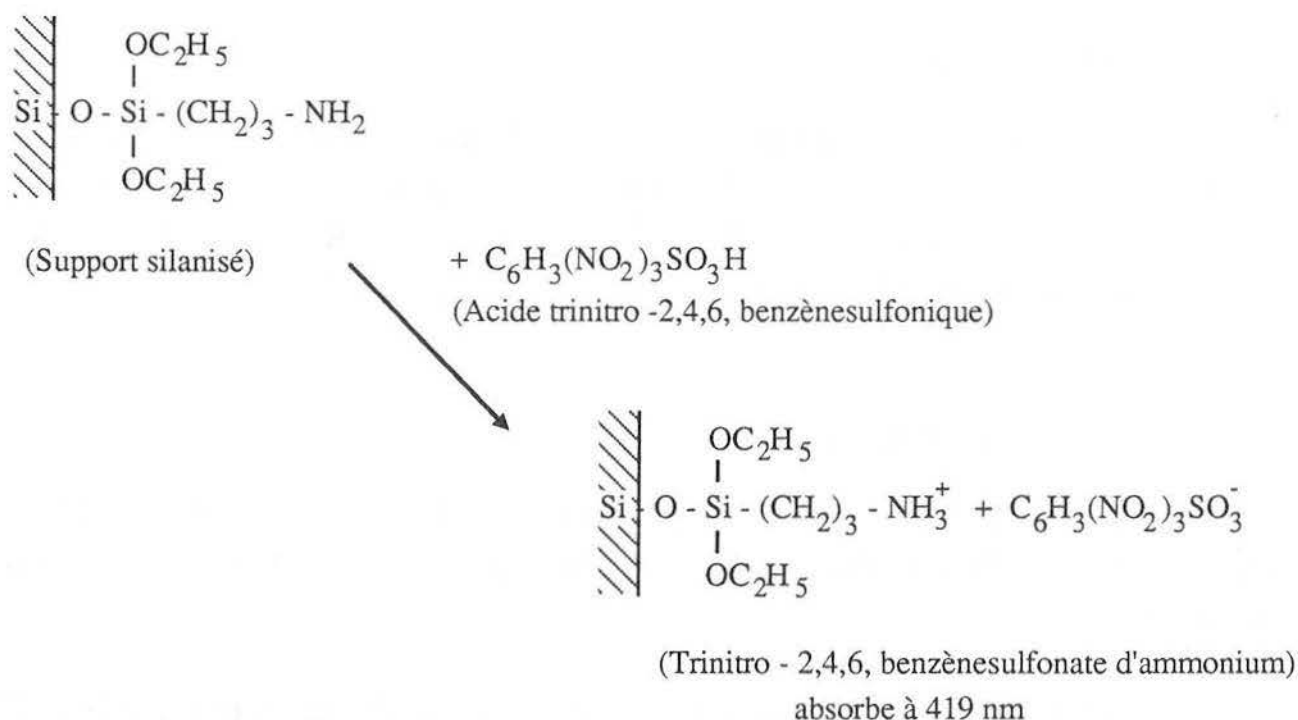


Figure 4.4 Dosage des groupements amines par formation du trinitrobenzènesulfonate d'ammonium par l'intermédiaire de l'acide trinitrobenzènesulfonique.

4.2.3 MONTAGE DE LA FIA

La configuration du système utilisé est décrite dans la Figure 4.5. Tous les composants, excepté l'électrode de pH, sont fournis par Bioblock® Scientifique (France). Des tubes en PTFE ($\phi_{\text{int}} = 0,5 \text{ mm}$) sont utilisés dans tout le montage.

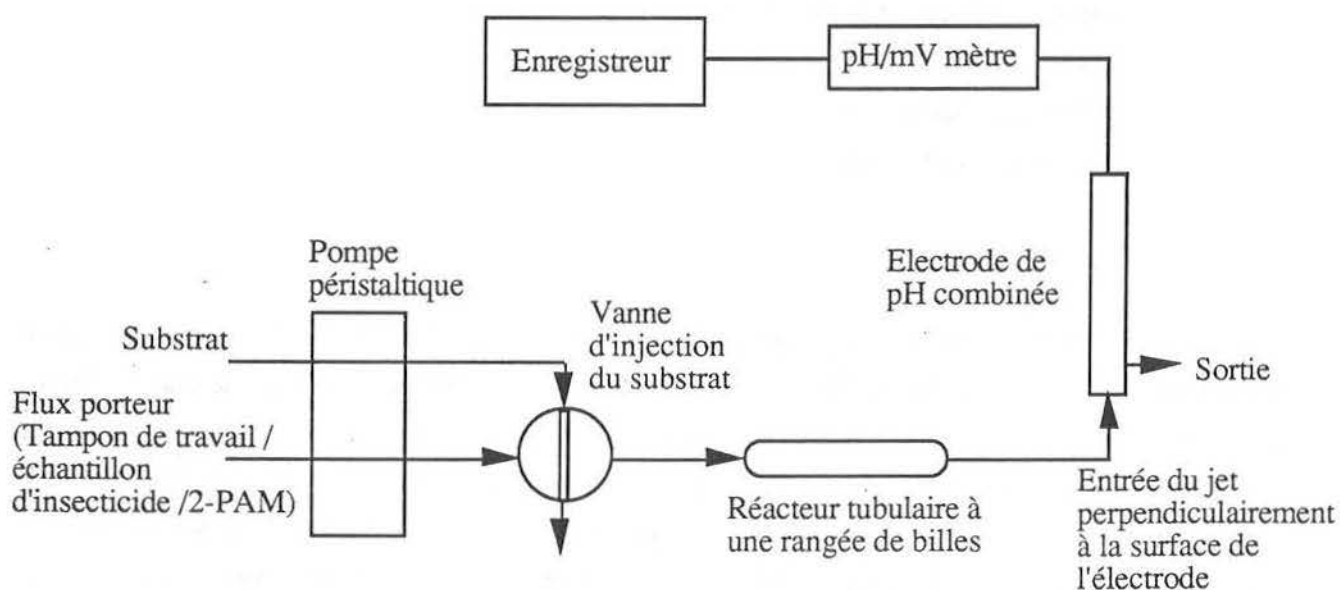


Figure 4.5 Représentation schématique du montage expérimental de FIA utilisé pour la détermination d'insecticides.

4.2.3.1 Système porteur

Le flux porteur (tampon de travail HEPES 2,5 mM) est pompé à travers le montage par une pompe péristaltique (Ismatec®) à 2 canaux à vitesse constante (40 tr/min). Le débit du flux peut varier par l'utilisation de tubes Tygon® de diamètres internes différents. Dans nos expériences, nous le fixons à 0,45 ml.min⁻¹ avec un tube Tygon® de 0,38 mm de diamètre interne.

4.2.3.2 Système d'injection

Les échantillons de substrat (250 µl d'une solution d'ACh 0,5 mM dans du tampon de travail HEPES 2,5 mM) sont injectés dans le flux porteur par une vanne rotative à 4 voies de type Rhéodyne.

4.2.3.3 Réacteur tubulaire à une rangée de billes ("Single bead string reactor"- SBSR)

Les tubes de verre de 10 cm de longueur sont nettoyés par une solution d'Extran® MA 02 neutre (Merck®, Darmstadt, Allemagne) et rincés par de l'eau distillée. Les billes de verre à AChE sont insérées dans les tubes en une seule rangée et accumulées régulièrement. Le rapport entre le diamètre du tube et le diamètre des billes est de 1.76. Le réacteur est maintenu à une température constante de 25°C dans un bain thermostaté à circulation d'eau.

Ce réacteur tubulaire, dans lequel il n'existe qu'une seule rangée de billes, présente les caractéristiques nécessaires à un réacteur en ligne :

- mélange direct et efficace des réactifs
- dispersion limitée
- faible résistance au flux
- simplicité et coût réduit

4.2.3.4 Détecteur

Le dispositif d'entrée par jet perpendiculaire ("wall-jet entry") à la membrane plane d'une électrode de pH combinée (Type Lo T453-57, Ingold®, France) est présenté dans la Figure 4.6. Il est usiné à partir d'une pièce cylindrique pleine en PTFE ($\varnothing = 1.58$ cm, $L = 1.8$ cm). Un canal permet l'introduction d'un morceau d'aiguille de seringue 21G ($\varnothing = 0.8$ mm). Cette aiguille creuse dépasse de 0,4 mm au-dessus de la surface de la pièce en PTFE. Elle assure ainsi le passage et la sortie du jet dans l'espace entre la membrane de l'électrode et la pièce en PTFE. Ces deux composants sont fixés dans un corps de seringue en plastique de 10 ml. Toutes les dimensions positionnant le jet sont mesurées avec un microscope optique et sont maintenues

constantes pendant nos expériences. Le volume mort de la cellule du détecteur est d'environ 150 μl .

Des trous de sortie minuscules sont percés dans le corps de seringue en plastique pour permettre l'évacuation du flux après l'impact sur la membrane de l'électrode. Le flux sort sans contrainte de façon à limiter la pression dans les tubes du montage et éliminer ainsi les fuites.

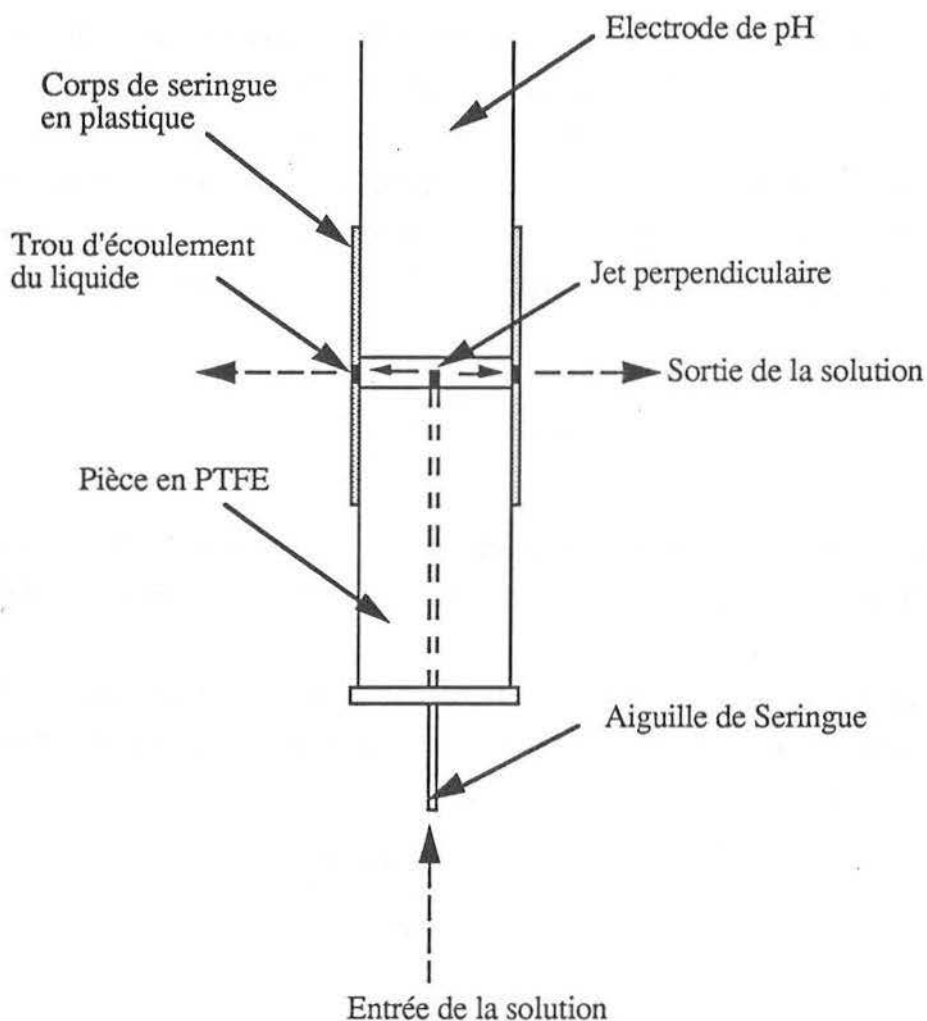


Figure 4.6 Schéma du détecteur comprenant un jet perpendiculaire et l'électrode de pH.

L'électrode de pH est connectée à un pH/mV mètre Radiometer® PHM64, lui-même relié à un enregistreur SEFRAM SRD.

4.3.5 REACTION ENZYMATIQUE

L'enzyme catalyse l'hydrolyse de l'ACh avec formation de choline et d'acide acétique suivant la réaction ci-dessous. L'acide se dissocie ensuite en relargant des ions H^+ , qui sont captés par l'électrode de pH.



4.2.5 DOSAGE DE L'INSECTICIDE

L'activité initiale de l'enzyme immobilisée est d'abord déterminée en enregistrant la différence de potentiel (d.d.p.), ou le changement de pH, lorsque le substrat est injecté dans le tampon du flux continu à travers le réacteur.

La solution d'insecticide est préparée dans un milieu d'eau de mer synthétique (NaCl 500 mM à pH 8,0). Pour accroître le pouvoir inhibiteur des esters organophosphorés, leur liaison P=S est oxydée en P=O à l'aide d'une solution très diluée d'eau de brome (5×10^{-7} % (v/v)). La solution contenant l'insecticide (6,75 ml) est ensuite envoyée dans la ligne porteuse et dans le réacteur à la place du tampon de travail, pendant 15 minutes exactement. Alors, le tampon de travail est réintroduit dans la ligne porteuse. Le substrat est à nouveau injecté pour déterminer l'activité de l'enzyme inhibée. Le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique est calculé d'après l'expression :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(E_0 - E)}{E_0} \times 100$$

où, E_0 est la hauteur du pic (en mV) correspondant à l'activité enzymatique initiale,
 E est la hauteur du pic (en mV) correspondant à l'activité de l'enzyme inhibée.

Chaque cycle, consistant en une mesure du témoin et une mesure d'inhibition, dure environ 20 à 25 minutes. La Figure 4.7 représente les pics typiques de sortie obtenus dans un test de détermination d'inhibiteur.

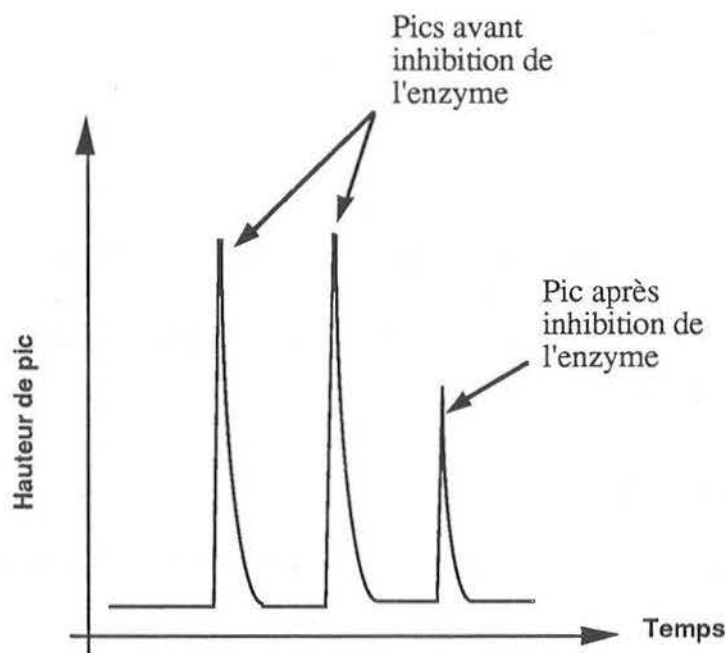


Figure 4.7

Allure des pics caractéristiques obtenus en injection en flux continu, avant et après inhibition de l'enzyme.

A partir de la hauteur des pics, il est possible de tracer les courbes d'étalonnage donnant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de plusieurs insecticides. La limite de détection de l'insecticide est fixée comme étant la concentration de l'insecticide qui correspond à 10 % d'inhibition.

Il est possible de réactiver l'enzyme inhibée en faisant passer dans le système une solution de tampon de travail contenant 20 μM de 2-PAM pendant 15 minutes, avant la réutilisation du réacteur.

Pour éliminer toute contamination du montage par les solutions d'insecticides utilisées préalablement, on envoie de la soude 10 mM, puis de l'eau distillée, à travers le système pendant 15 à 20 minutes, après toutes les 40 à 50 mesures d'inhibition. Les tubes de verre du réacteur sont lavés successivement par de l'éthanol et par une grande quantité d'eau distillée. Ils sont ensuite laissés toute une nuit en solution sodique, puis rincés avec de l'eau distillée, avant d'être à nouveau remplis avec des billes de verre neuves.

4.3 RESULTATS ET DISCUSSION

4.3.1 DETERMINATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

4.3.1.1 Débit et concentration de l'ACh

Toutes les expériences sont effectuées avec un réacteur de 10 cm de longueur. Nous étudions d'abord l'influence du débit et de la concentration de l'ACh sur la hauteur des pics. La Figure 4.8 présente nos résultats. La hauteur des pics augmente avec la concentration en substrat et diminue avec le débit. Par ailleurs, les conditions opératoires doivent répondre aux objectifs suivants :

- au cours de la réaction, l'enzyme ne doit pas subir une variation de pH trop importante, qui entraînerait une perte d'activité par un processus de dénaturation
- le débit doit offrir un temps de contact suffisant entre l'enzyme et l'insecticide, avec un volume limite de l'échantillon d'insecticide analysé (<10 ml).
- le nombre d'échantillons traités ne doit pas être affecté par un débit trop faible.

Pour cela, un débit de $0,45 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ est choisi pour les expériences ultérieures. Les Figures 4.9 (a) et (b) montrent les pics obtenus pour diverses concentrations d'ACh et la courbe d'étalonnage correspondante pour un débit de $0,45 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. La concentration de 0,5 mM est retenue car elle assure un retour rapide à la ligne de base et une plus grande sensibilité pour le dosage des pesticides.

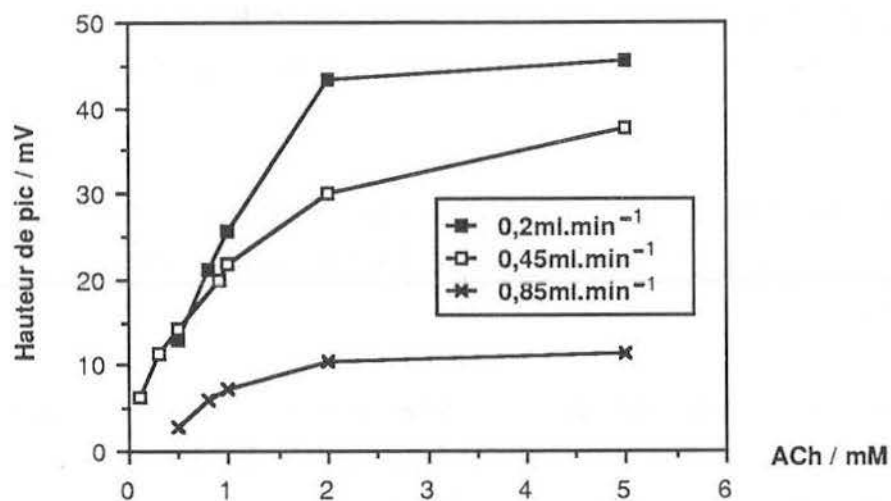


Figure 4.8

Influence du débit du porteur sur la hauteur de pics à différentes concentrations d'ACh.

Conditions opératoires : Tampon : HEPES 2,5 mM à pH 7,55.
Longueur du réacteur : 10 cm.
Température du bain : 25°C.

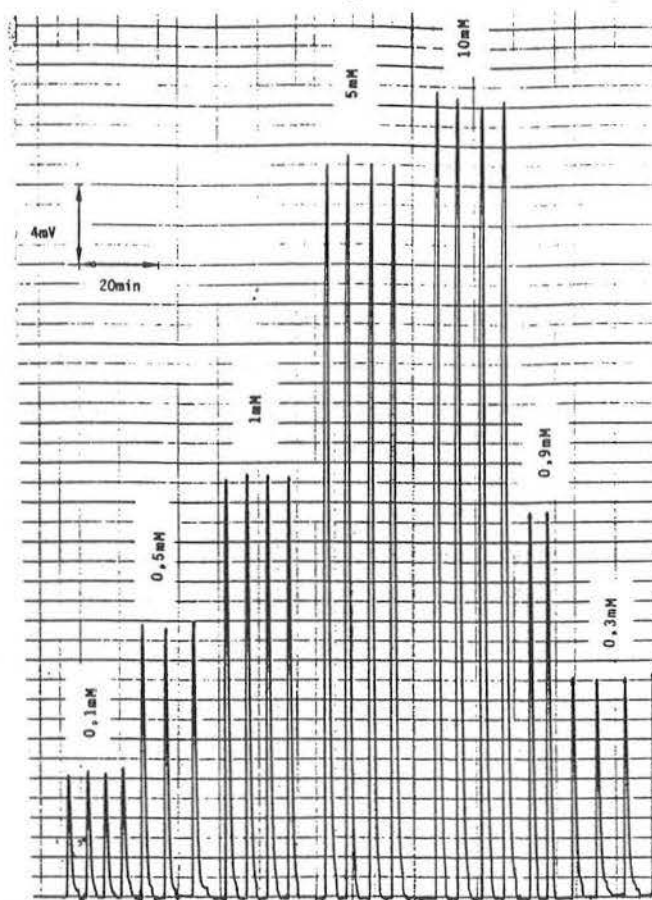


Figure 4.9 (a) Pics obtenus à différentes concentrations d'ACh.

Débit du porteur : 0,45 ml.min⁻¹.
Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.8.

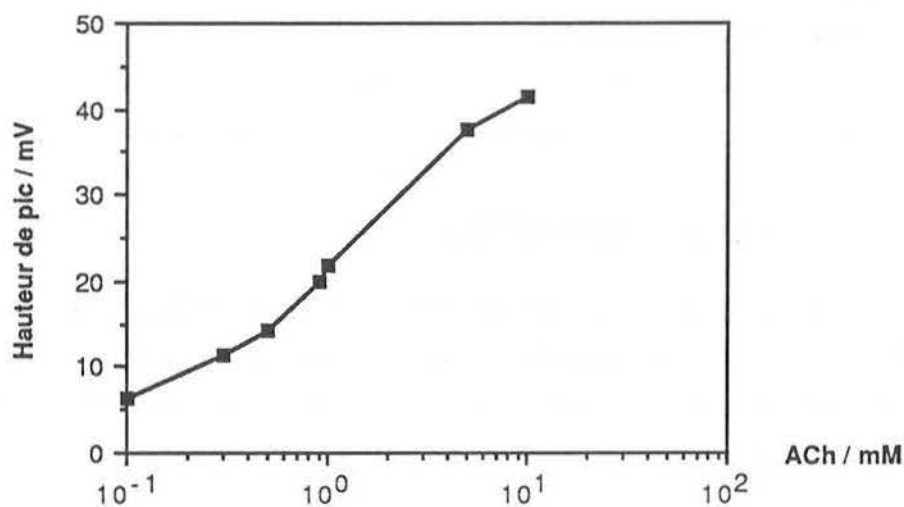


Figure 4.9 (b) Courbe d'étalonnage de l'ACh.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.9 (a).

4.4.1.2 Longueur du réacteur

Nous faisons varier la longueur du réacteur de 5 à 20 cm. La Figure 4.10 montre l'influence de ces variations sur la réponse du système. Nous observons que des longueurs supérieures à 10 cm n'entraînent pas une augmentation significative de la conversion catalytique totale de 0,5 mM d'ACh, avec un débit de 0,45 ml.min⁻¹. Donc, pour cette concentration en

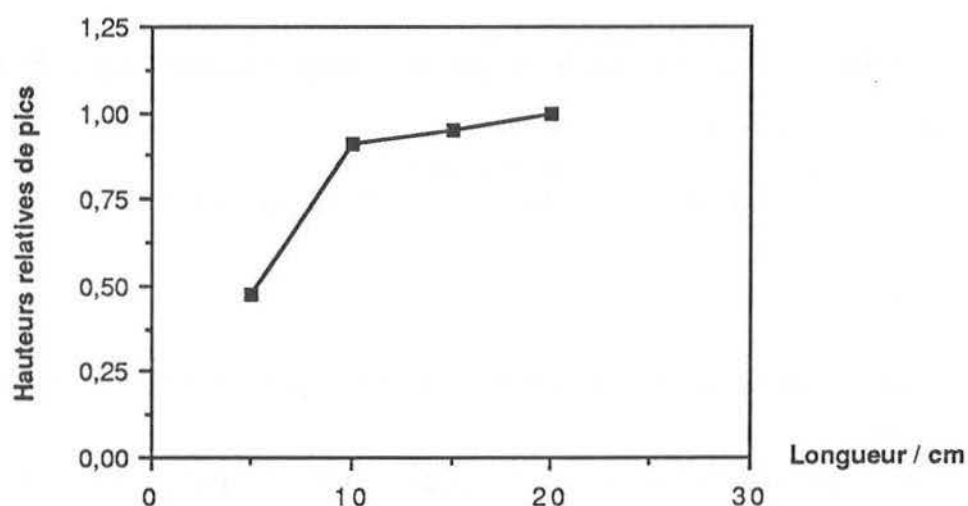


Figure 4.10 Influence de la longueur du réacteur sur la hauteur du pic.

Concentration d'ACh : 0,5 mM.
 Débit du porteur : 0,45 ml.min⁻¹.
 Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.8.

substrat et ce débit, un réacteur de 10 cm possède la quantité nécessaire et suffisante d'enzyme pour effectuer une conversion pratiquement totale.

De plus, des tubes plus longs provoquent une dispersion des échantillons plus importante, donc une perte de sensibilité. Ils sont aussi plus difficiles à manipuler.

4.3.1.3 Concentration du tampon HEPES

Nous observons que l'augmentation des concentrations d'HEPES dans le tampon de travail, amortit progressivement la réponse de l'électrode (Figure 4.11). Une concentration d'HEPES de 2,5 mM, telle qu'elle a été définie dans les études précédentes [37], donne un pouvoir tampon satisfaisant, pour maintenir une ligne de base stationnaire et limiter la dérive.

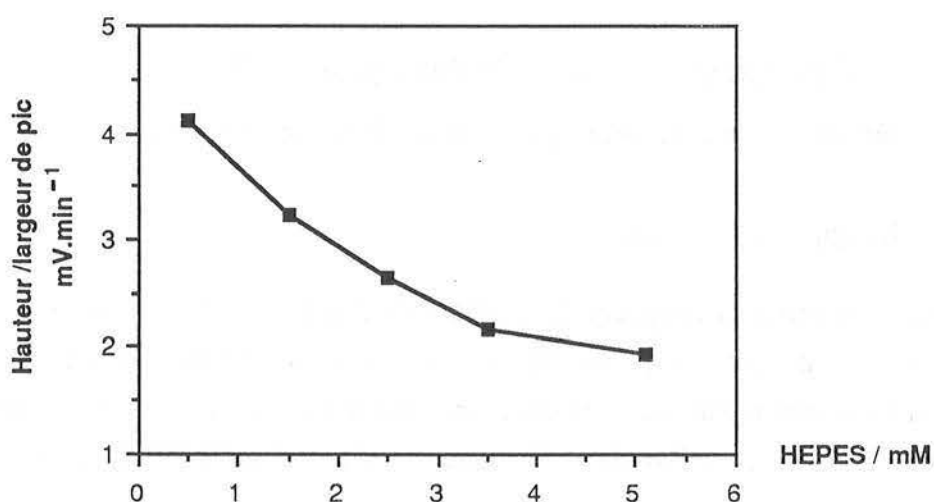


Figure 4.11 Effet de la concentration du tampon sur le rapport hauteur/largeur de pic.

Concentration d'ACh : 0,5 mM.
 Débit du porteur : 0,45 ml.min⁻¹.
 Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.8.

4.3.1.4 pH

Nous faisons varier le pH du tampon de travail HEPES pour déterminer son influence sur la réponse du système.

Nous avons tracé les courbes, d'une part, des hauteurs du pic, et d'autre part, des rapports entre la hauteur du pic et sa largeur à la base, en fonction du pH (Figure 4.12). Pour les deux courbes, un minimum est observé à un pH compris entre 7,5 et 7,6. Ce pouvoir tampon maximal correspond au pKa de l'HEPES, noté dans la littérature [106] comme étant de 7,55 à 25°C.

Quand on fait monter le pH du flux, la production des ions H⁺ augmente. La réponse plus importante se traduit par une hauteur de pic plus grande (courbe (a)). Cette élévation des ions

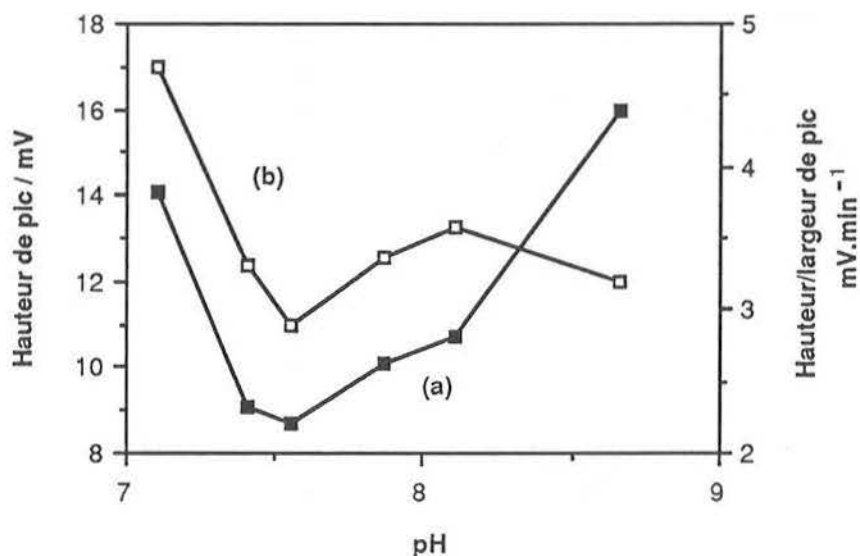


Figure 4.12 Influence du pH du flux porteur sur (a) la hauteur de pic et (b) le rapport hauteur/largeur de pic.

Concentration d'ACh : 0,5 mM.

Débit du porteur : 0,45 ml.min⁻¹.

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.8.

H⁺ accentue leur diffusion axiale. La largeur du pic augmente et le rapport hauteur/largeur diminue (courbe (b)).

Le pH de l'eau de mer étant d'environ 8,0 [107], nous choisissons donc un pH de travail de 8,0 pour l'analyse des insecticides.

4.4.1.6 Température du bain du réacteur

Pour toutes les expériences mentionnées ci-dessus, le réacteur est placé dans un bain d'eau thermostaté à 25°C. Cependant, la température réelle à l'intérieur du réacteur, bien que non-mesurée, est considérée comme légèrement inférieure à 25°C, en raison du flux continu et de la température ambiante inférieure à 25°C. L'influence de la température du bain d'eau sur la hauteur des pics est montrée dans la Figure 4.13. Une activité enzymatique maximale est notée pour une température de bain d'eau de 40°C. Des températures plus élevées provoquent l'inactivation de l'enzyme.

4.4.1.7 Temps de contact entre l'enzyme et l'insecticide

Nous étudions l'influence du temps de contact entre l'enzyme et l'insecticide de façon à sélectionner les durées de passage des solutions d'insecticides dans le réacteur les plus favorables. Dans ce but, une solution de 0,2 µM de Paraoxon, préparée dans du tampon HEPES 2,5 mM est envoyée dans le réacteur pendant différentes périodes de temps et chaque fois, nous

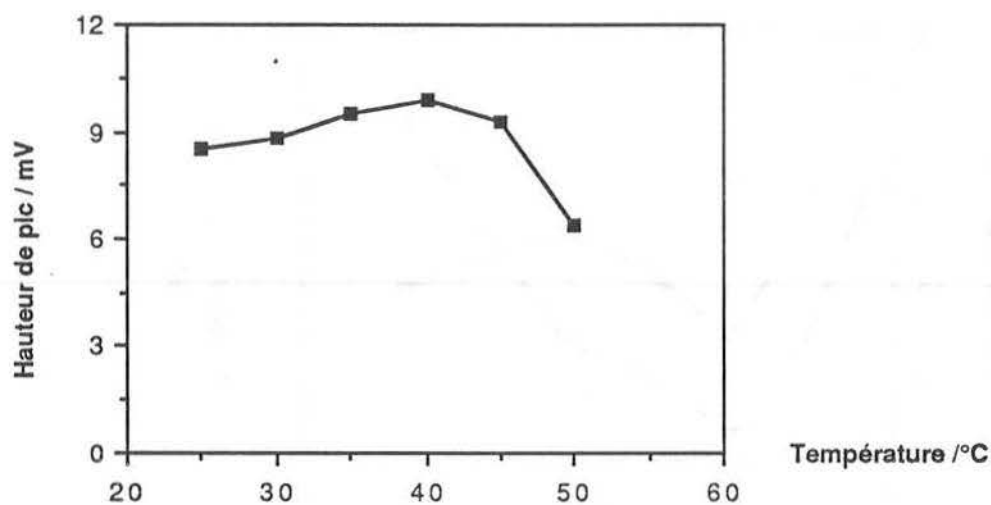


Figure 4.13 Influence de la température du bain du réacteur sur la hauteur de pic.

Concentration d'ACh : 0,5 mM.
Débit du porteur : 0,45 ml.min⁻¹.
Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.8.

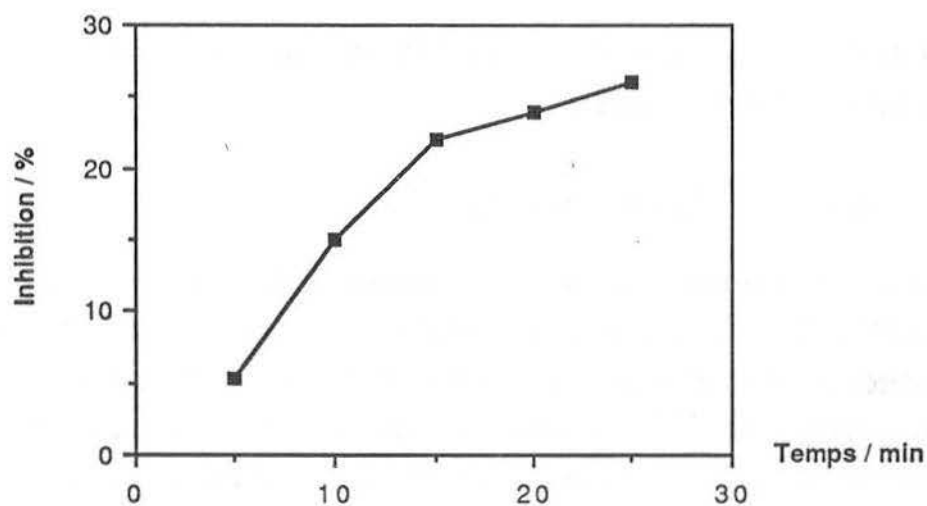


Figure 4.14 Effet du temps de contact enzyme-insecticide sur le pourcentage d'inhibition de l'enzyme.

Concentration d'ACh : 0,5 mM.
Débit du porteur : 0,45 ml.min⁻¹.
Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.8.

mesurons le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique résultante (Figure 4.14). Certes, des temps de contact plus longs entraînent des pourcentages d'inhibition plus élevés, donc la possibilité de limites de détection plus faibles, mais nous devons prendre en compte les autres contraintes, tels que le volume de l'échantillon et le nombre d'échantillons traités; aussi nous décidons de restreindre ce temps de contact à 15 minutes.

4.3.1.7 Température d'inhibition

L'augmentation de la température accroît la vitesse d'inhibition de l'enzyme, à condition de ne pas atteindre la température provoquant la dénaturation thermique de l'enzyme.

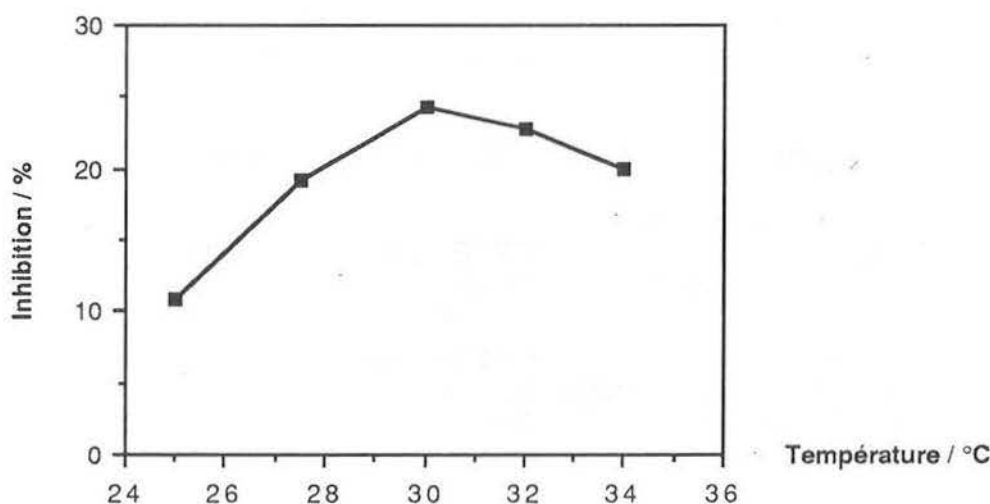


Figure 4.15 Influence de la température du bain du réacteur sur le pourcentage d'inhibition de l'enzyme.

Temps de contact : 15 min.

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.14.

Pour les tests d'inhibition, la Figure 4.15 montre une température optimale du bain d'eau à 30°C, pour une solution de Paraoxon 0,2 μ M. Tous les autres insecticides sont analysés avec le réacteur maintenu dans un bain thermostaté à 30°C.

4.3.2 PERFORMANCES DU SYSTEME FIA

4.3.2.1 Dosage des insecticides dans de l'eau de mer synthétique

Nous vérifions tout d'abord que la préparation d'eau de mer synthétique n'a pas, elle-même, d'effet inhibiteur sur l'activité enzymatique. Ensuite, nous étudions le pouvoir inhibiteur de l'éthanol, car, la plupart des insecticides testés sont peu solubles dans l'eau, et les solutions mères sont préparées dans l'éthanol. Nous observons qu'une concentration d'éthanol inférieure à 5 % (v/v), n'inhibe pas l'enzyme. Or, la concentration d'éthanol dans nos solutions

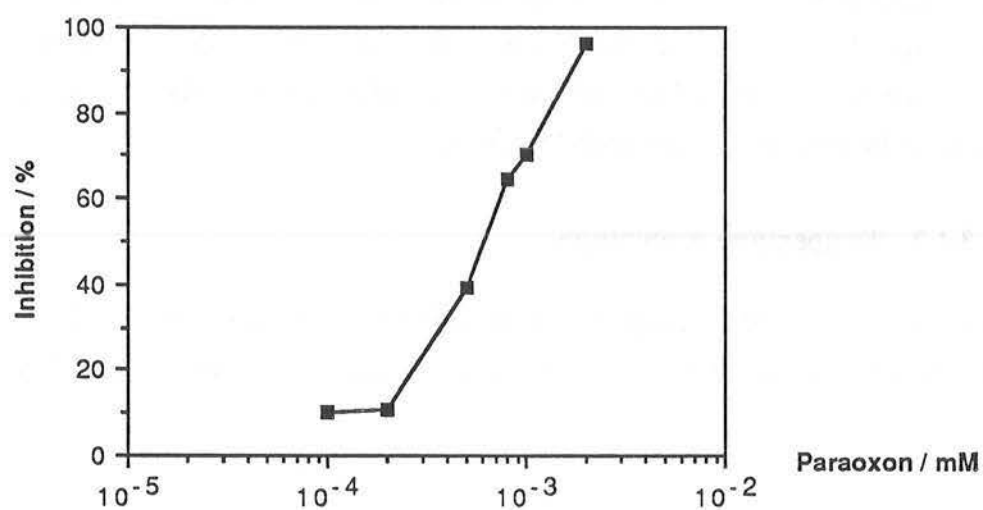


Figure 4.16 Courbe d'étalonnage du Paraoxon.

Conditions opératoires :

Tampon : HEPES 2,5 mM à pH 8,0.

Longueur du réacteur : 10 cm.

Concentration d'ACh : 0,5 mM.

Débit du porteur : 0,45 ml.min⁻¹.

Temps de contact (enz-tox) : 15 min.

Température du bain : 30°C.

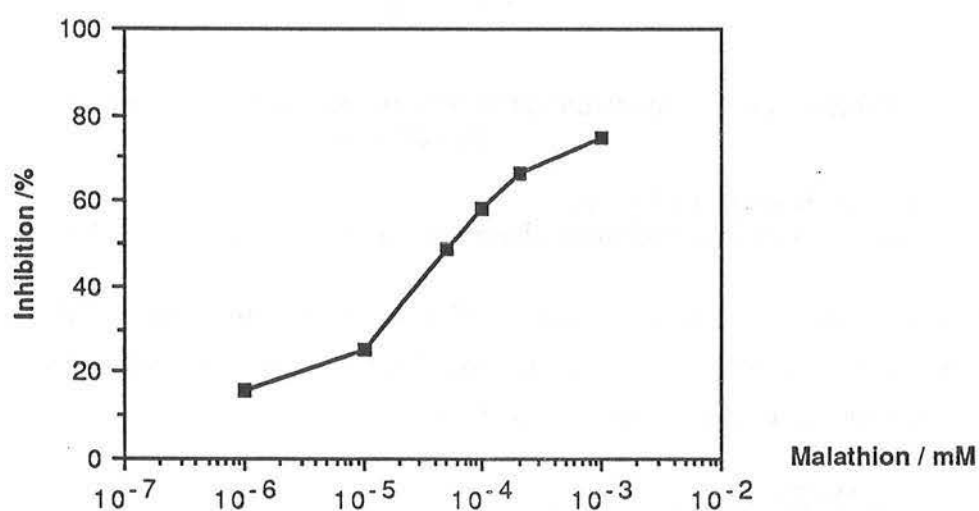


Figure 4.17 Courbe d'étalonnage du Malathion.

Conditions opératoires : identiques à celles de la Figure 4.16.

finale d'insecticides est inférieure à 5 % (v/v), car nous diluons toujours diluer les solutions mères avant l'analyse.

Puis, nous établissons les courbes d'étalonnage du Paraoxon et du Malathion. Elles sont présentées dans les Figures 4.16 et 4.17.

Enfin, nous testons d'autres insecticides pour déterminer leur limite de détection (qui correspond à une diminution de 10 % de l'activité enzymatique). Les résultats de ces tests, indiqués dans le Tableau 4.1, montrent que des limites de détection de l'ordre du p.p.b. (partie par billion) sont aisément obtenues avec ce système.

Insecticide	Limite de détection (p.p.b.)
Méthyl Azinphos	8
Ethyl Azinphos	1
Méthyl Bromophos	275
Carbaryle	50
Carbofurane	6
Dichlorovos	50
Fenitrothion	45
Malathion	0.5
Paraoxon	25
Ethyl Parathion	10
Méthyl Parathion	15

Tableau 4.1 Limites de détection de différents insecticides (1 p.p.b. \equiv 1 ng.ml⁻¹).

4.3.2.2 Réactivation du réacteur enzymatique

Nous étudions la réactivation de l'enzyme inhibée par des concentrations croissantes de Paraoxon. Cette réactivation est effectuée par le passage d'une solution de 2-PAM 20 μ M pendant 15 minutes dans le réacteur. Nous observons que l'enzyme retrouve 94 % de son activité initiale, après une inhibition supérieure à 88,4 %. Les pics obtenus sont présentés sur la Figure 4.18.

A la différence des études précédentes [36] dans lesquelles une réactivation pratiquement totale de l'enzyme inhibée n'est possible qu'après quelques jours de contact avec le

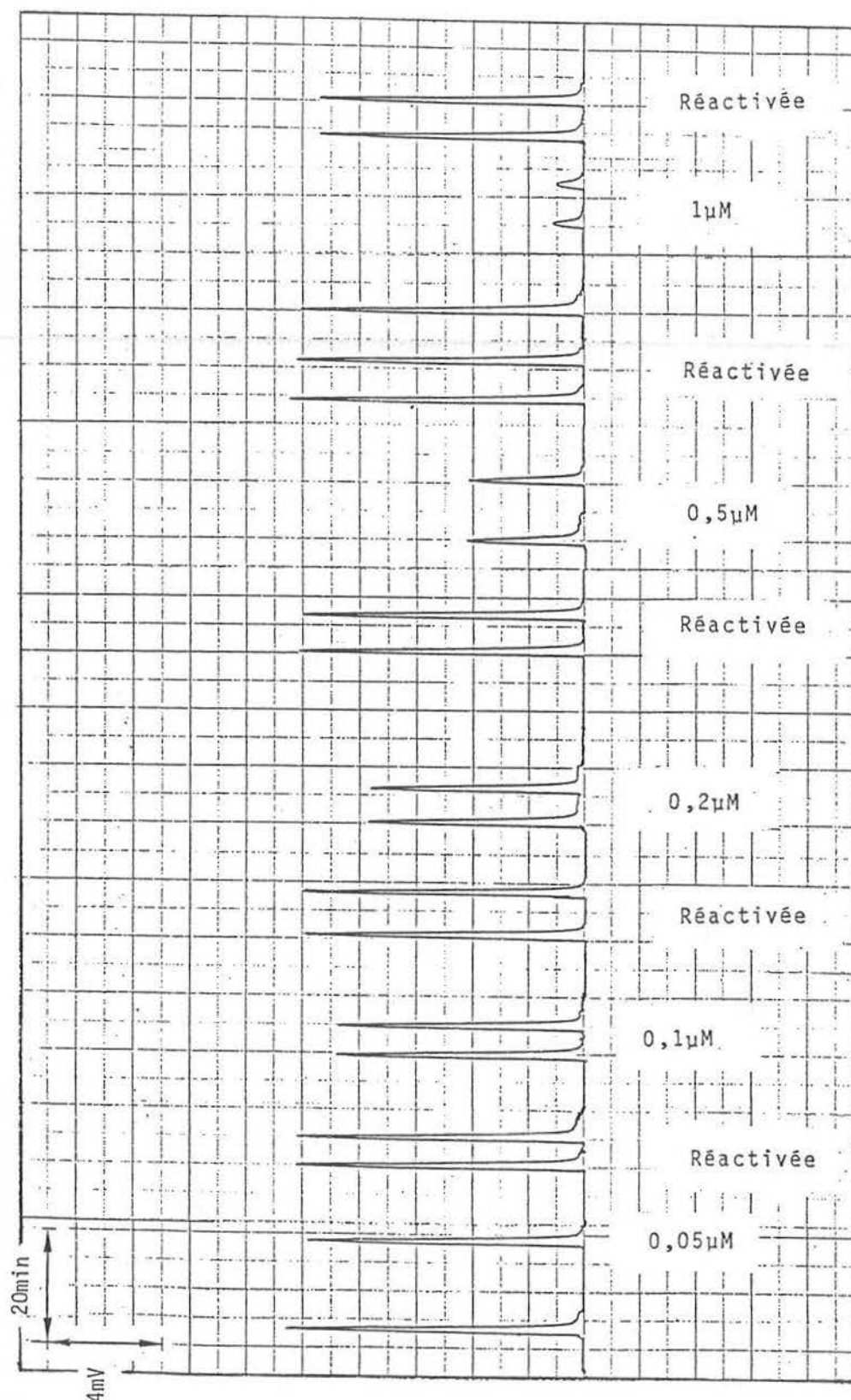


Figure 4.18 Inhibition (par du Paraoxon) et réactivation (par du 2-PAM 20 µM) de l'AChe immobilisée dans le réacteur tubulaire à rangée de billes.

Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.16.

2-PAM, notre montage permet une réactivation pratiquement complète beaucoup plus rapidement. Ceci est dû essentiellement au fait que la réactivation est effectuée dans un système à flux continu.

Un tel système permet :

- la réactivation en présence du réactivateur seul, ce qui élimine ainsi les interférences dues aux liaisons compétitives du substrat et à la réinhibition de l'enzyme par l'oxime phosphorylé
- l'élimination de l'inhibition réversible, possible avec les oximes, par le lavage avec le tampon, qui a lieu juste avant la détermination de l'activité de l'enzyme réactivée.

4.3.2.3 Reproductibilité et précision

La reproductibilité des pics obtenus pour de nombreuses injections successives de substrat est déterminée comme indiqué dans la Figure 4.19. Le coefficient de variance est de 2,54 % pour 30 injections.

Le coefficient de variance (pour $n = 6$) trouvé pour l'inhibition par $0,2 \mu\text{M}$ de Paraoxon à 30°C , est de 6,07 %.

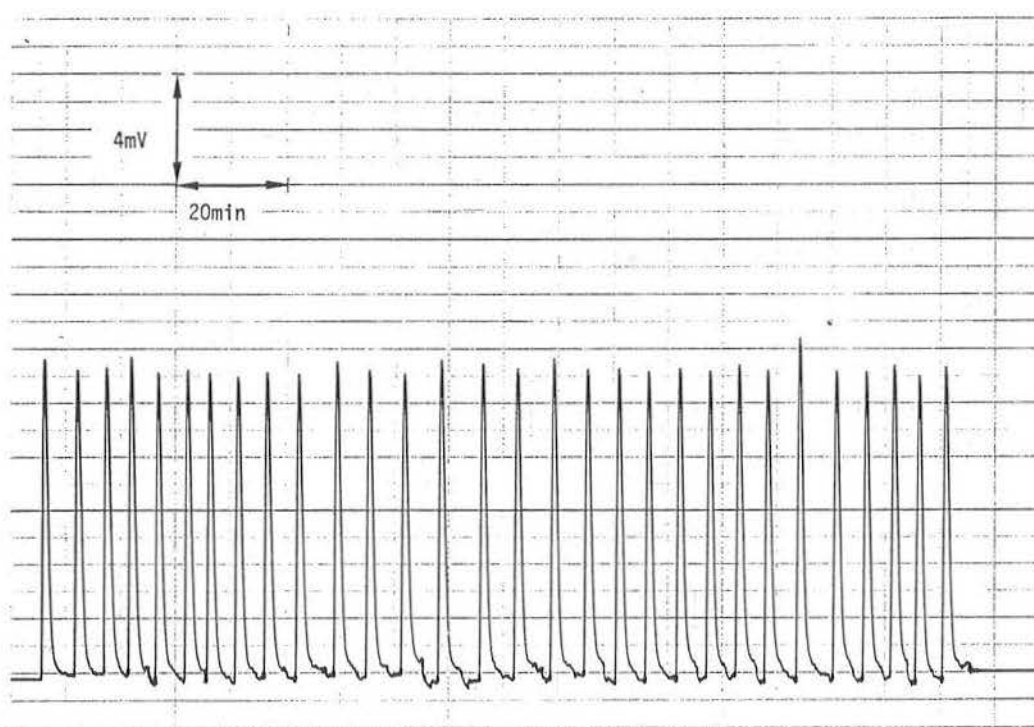


Figure 4.19 Reproductibilité des pics d'injection de l'ACh $0,5 \text{ mM}$. Hauteur moyenne de pic = $11,5 \text{ mV}$; Coeff. de var. = 2,54 % pour $n = 30$.

Débit du porteur : $0,45 \text{ ml.min}^{-1}$.
 Température : 30°C .
 Autres conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.16.

4.3.2.4 Nombre d'échantillons traités

Chaque cycle analytique (cycle comprenant la mesure du témoin, l'inhibition et la réactivation) de l'enzyme durant environ 40 minutes, le dosage de 3 échantillons est donc possible en deux heures. Ce nombre d'échantillons pourrait être augmenté si le système était équipé pour opérer à débit élevé dans le transport du liquide du réservoir au réacteur, lorsqu'un changement de liquide dans la ligne porteuse est nécessaire (passage du tampon à l'insecticide, de l'insecticide au tampon, du tampon au 2-PAM et du 2-PAM au tampon).

4.3.2.5 Stabilité

Les billes de verre sur lesquelles l'enzyme est immobilisée, et qui sont stockées à 4°C, présentent une activité enzymatique stable pendant 12 semaines. Ensuite, une chute de 9 % et de 17 % est observée, respectivement, à la fin de la 14^{ème} et de la 16^{ème} semaine.

Par ailleurs, la Figure 4.20 montre la stabilité du réacteur en fonctionnement permanent, avec circulation en continu du tampon de travail HEPES et une température de bain d'eau maintenue à 30°C. Dans ces conditions, une chute de 25 % de l'activité enzymatique est observée au bout de 3 jours.

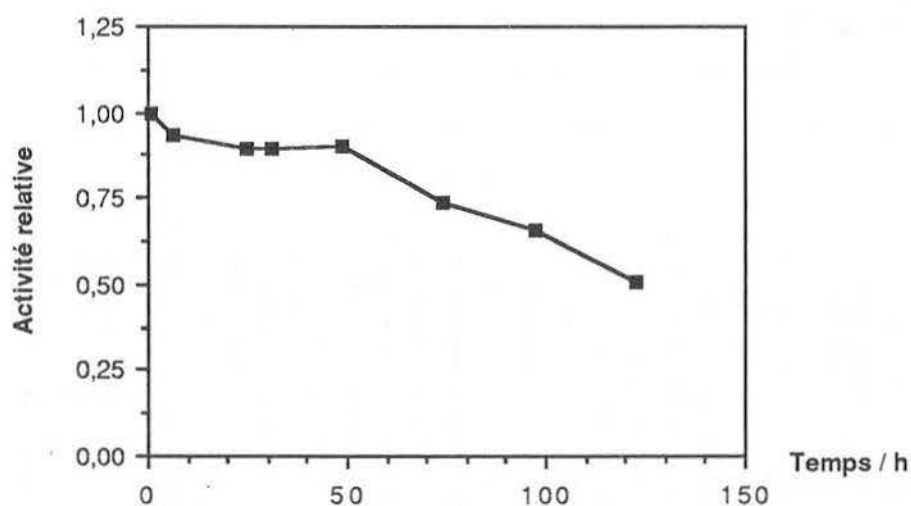


Figure 4.20 Stabilité du réacteur tubulaire à rangée de billes en fonctionnement continu.

Conditions opératoires identiques à celles de la Figure 4.19.

4.4 CONCLUSIONS

- L'AChE fixée sur les billes de verre et son utilisation dans un réacteur tubulaire à une rangée de billes ("Single Bead String reactor-SBSR") permet un bon contrôle de la quantité d'enzyme utilisée pour le dosage des insecticides organophosphorés et des carbamates.

- Les valeurs optimales des paramètres de fonctionnement du système sont présentées dans le Tableau 4.2.

Paramètre étudié	Valeur optimum
Longueur de tube du réacteur	10 cm
Diamètre du tube	1,1 mm
Diamètre des billes	0,5 à 0,75 mm
Débit du porteur	0,45 ml.min ⁻¹
Concentration d'ACh	0,5 mM
Concentration du tampon HEPES	2,5 mM
pH du tampon	8,0
Température du bain	30°C
Temps de contact (Enzyme-toxique)	15 min

Tableau 4.2 Valeurs optimales des différents paramètres de fonctionnement du système FIA.

- Des limites de détection satisfaisantes (de l'ordre du p.p.b.) et une bonne reproductibilité des mesures sont obtenues pour de nombreux insecticides organophosphorés et carbamates analysés dans de l'eau de mer synthétique (Tableau 4.1).

- Le réacteur présente une très bonne stabilité de stockage à 4°C (aucune perte d'activité pendant 12 semaines) et en opération continue à 30°C (perte d'activité de 25 % au bout de 3 jours).

- Ce système présente un inconvénient au niveau de la vitesse des analyses. Le faible nombre d'échantillons traités par heure (1,5) est dû à la cinétique lente de l'inhibition et de la réactivation. Cependant, un nombre de dosages plus élevé pourrait être obtenu si le système était équipé pour opérer à des débits élevés, en cas de nécessité.

- A la différence d'autres systèmes FIA mis au point pour le dosage des inhibiteurs des cholinestérases, ce système présente les avantages d'être simple à construire, compact, pratique d'emploi et bon marché.

- La possibilité de réactiver presque complètement l'enzyme après une inhibition de 88,4 % de son activité, permet la réutilisation de l'enzyme.

Par ses caractéristiques et ses performances, ce système est adapté pour les analyses sur le terrain.

CONCLUSION

Les électrodes ampérométriques modifiées chimiquement (TCNQ-TTF⁺), revêtues d'acétylcholinestérase et de choline oxydase sont utilisées pour le dosage d'acétylcholine et de nicotine, inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Mais ces électrodes qui utilisent deux enzymes différentes, rendent le dosage de l'inhibiteur plus complexe ; il est en effet difficile, par la réponse de l'électrode, de discerner quelle est l'enzyme qui est inhibée. Les expériences passées montrent que de simples électrodes de pH en verre recouvertes avec des cholinestérases donnent de meilleurs résultats pour le dosage d'inhibiteurs, en ce qui concerne la limite de détection et la stabilité à long terme du capteur.

Des membranes pré-activées en polyamide, (PALL™) sur lesquelles l'acétylcholinestérase est immobilisée, sont utilisées avec une électrode de pH en verre pour le dosage d'inhibiteurs tels que les insecticides, les herbicides et les solvants organiques. La préparation de ces membranes enzymatiques est faite par dépôt par goutte ("spot-wetting") d'une solution d'enzyme. La rétention de l'enzyme sur ces membranes est meilleure lorsque celles-ci sont préparées par ajout de solutions diluées de glutaraldéhyde et d'albumine de sérum humain, après dépôt de la solution d'enzyme. La préparation par lots, par immersion des membranes dans la solution enzymatique, montre une meilleure reproductibilité du signal que la préparation des membranes unitairement par dépôt par goutte.

L'acétylcholinestérase est également immobilisée sur Pd/PdO, Ir/IrO₂ et électrode de pH en verre, par piégeage dans un gel d'hydrazide de copolymère d'acrylamide et de méthacrylamide qui est réticulé avec le glyoxal. Le biocapteur en verre est alors utilisé pour le dosage d'inhibiteurs tels que la nicotine, les ions fluorure et les insecticides organophosphorés. L'acétylcholinestérase inhibée par la nicotine et les ions fluorure peut être facilement réactivée, ce qui permet la réutilisation du biocapteur pour de nombreux dosages. Ces biocapteurs étant préparés unitairement, une reproductibilité moindre du signal est notée.

Les méthodes d'immobilisation d'enzyme sur des membranes PALL™ et dans le gel de copolymère sont comparées à la méthode d'immobilisation sur toile de Nylon™ utilisée auparavant. Des quantités identiques de butyrylcholinestérase sont utilisées dans chaque cas et les capteurs sont testés avec les mêmes inhibiteurs. Les avantages de la préparation des membranes PALL™ et des membranes de Nylon™ résident dans sa simplicité, sa rapidité et une demande minime de minutie. La possibilité de les produire en série par lots entraîne une meilleure reproductibilité du signal. Aucune différence significative n'est observée au niveau des sensibilités et des limites de détection des inhibiteurs testés, à l'exception de la membrane avec gel de copolymère qui montre un seuil de détection 4 fois plus faible pour le paraoxon. Lorsqu'elles sont stockées à sec à 4 °C, les membranes PALL™ et les membranes Nylon™ ne montrent pas de perte

d'activité enzymatique, au bout de 3 ans. Par contre, leur stabilité est moins bonne lorsqu'elles sont conservées en milieu liquide.

L'électrode sélective à ammonium à nonactine est utilisée pour le dosage des ions ammonium et de l'urée (après immobilisation de l'uréase) dans du tampon contenant des ions interférents (Na^+ et K^+). Les courbes d'étalonnage sont établies à la fois pour les ions ammonium et pour l'urée. *Les dosages de l'urée, avec ce biocapteur, dans des échantillons de sérum humain, sont tout à fait comparables à ceux obtenus par spectrophotométrie.*

La nouvelle technique d'immobilisation d'enzyme (Brevet français : F-9011630, 1990) [83], dans laquelle l'adsorption de l'enzyme sur la surface d'une électrode de pH en verre est suivie par la vaporisation d'une solution diluée de glutaraldéhyde, assure une très faible épaisseur de la couche enzymatique (1 à 2 μm) et un temps de réponse particulièrement court (5 à 10 secondes). Ces temps de réponse sont, jusqu'à maintenant, *les plus faibles enregistrés* avec les électrodes enzymatiques. La solution d'enzyme utilisée dans ce procédé d'immobilisation nécessite une forte activité spécifique ($> 1000 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine). Une simulation mathématique de la réponse de ces électrodes permet l'estimation des quantités d'enzyme immobilisées sur l'électrode. Celles-ci varient de 6 à 8 UI ce qui traduit la très forte densité enzymatique, étant donné l'épaisseur de la couche.

L'acétylcholinestérase est aussi immobilisée dans un réacteur tubulaire à une rangée de billes ("Single Bead String Reactor") et utilisée dans un système d'analyse par injection en flux continu (FIA) pour le dosage de quelques insecticides. Par rapport aux biocapteurs, ce système présente des avantages indéniables : sa sensibilité permet le dosage d'insecticides de l'ordre du p.p.b. (partie par billion) ; sa simplicité, la possibilité de réactiver l'enzyme, la séparation du réacteur contenant le biocomposant et du transducteur, assurent une grande souplesse d'emploi et résolvent certains problèmes posés par les biocapteurs. De ce fait, *le système d'analyse par injection en flux continu, comparé aux biocapteurs, occupe une place de choix en technique analytique.*

Des biocapteurs pour le dosage de substrats et d'inhibiteurs ont déjà été conçus et réalisés. Cependant, la recherche est poursuivie dans ce domaine pour améliorer la technologie de fabrication existante, afin d'obtenir des biocapteurs plus performants. C'est dans cet esprit que le présent travail a été conduit. Il reste encore de nombreux aspects du biocapteur à mettre au point (reproductibilité, stabilité, biocompatibilité, minimisation des interférences, ...) et les études sont orientées dans ce sens, car il est aujourd'hui envisageable que *ces dispositifs puissent révolutionner la méthodologie analytique.*

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SCHELLER, F.W., SHUBERT, F., RENNEBERG, R., MÜLLER, H.G., JÄNCHEN, M., WEISE, H., 1985, Biosensors : Trends and Commercialization, *Biosensors*, 1, p.135-160.
- [2] LOWE, C.R., 1985, An Introduction to the Concepts and Technology of Biosensors, *Biosensors*, 1, p.3-16.
- [3] TURNER, A.P.F., SWAN, A., 1988, Commercial Perspectives for Diagnostics Using Biosensor Technologies, *Amer. Biotechnol. Lab.* p.10-18.
- [4] ZABORSKY, O.R., 1974, Immobilized Enzymes, CRC Press, Cleveland, Ohio.
- [5] WEETALL, H.H., 1974, Immobilized Enzymes : Analytical Applications, *Anal. Chem.*, 46, p.602A-612A.
- [6] CARR, P., BOWERS, L.D., 1980, Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry, In Chemical Analysis, vol. 56., Ed. Elving P.J., Winefordner, J.D. and Kolthoff, I.M., John Wiley & Sons, Ch. 4, p.148-196.
- [7] LOWE, C.R., YON HIN, B.F.Y., CULLEN, D.C., EVANS, S.E., STEPHENS, L.D.J., MAYNARD, P., 1990, Biosensors, *J. Chromatogr.*, 510, p.347-354.
- [8] FREW, J.E., HILL, H.A.O., 1987, Electrochemical Biosensors, *Anal. Chem.*, 59, 15, p.933A-944A.
- [9] BORMAN, S., 1987, Biosensors: Potentiometric and Amperometric, *Anal. Chem.*, 59, 18, p.1091A-1098A.
- [10] RISPON, J., SHABTAI, Y., ROSEN, I., ZIBENBERG, Y., TOR, R., FREEMAN, A., 1990, In-situ Glucose Monitoring in Fermentation Broth by 'Sandwiched' Glucose Oxidase Electrode (SGE), *Biotechnol. Bioeng.*, 35, p.103-107.
- [11] GENSHAW, M.A., JONES, J.E., 1989, Whole Blood Glucose Enzyme Electrode, *J. Electrochem. Soc.*, 136, p.414-417.
- [12] KASUNO, H., 1989, Glucose Enzyme Electrode With Percutaneous Interface Which Operates Independently of Dissolved Oxygen, *Clin. Phys. Physiol. Meas.*, 10, p.1-9.
- [13] PALLESCHI, G., MASCINI, M., MARTINEZ-FABREGAS, E., ALEGRET, S., 1988, Urea Determination in Human Sera With an Ammonium Selective Electrode Made With Solid Inner Electric Contact and Immobilised Urease, *Anal. Letters*, 21, p.1115-1129.
- [14] CAMPANELLA, L., SAMMARTINO, M.P., TOMASSETTI, M., 1990, Suitable Potentiometric Enzyme sensors for Urea and Creatinine, *Analyst*, 115, p.827-830.
- [15] TOR, R., FREEMAN, A., 1986, New Enzyme Membrane for Enzyme Electrodes, *Anal. Chem.*, 58, p.1042-1046.
- [16] NILSON, H., AKERLUND, A.C., MOSBACH, K., 1973, Determination of Glucose, Urea and Penicillin Using Enzyme-pH Electrodes, *Biochim. Biophys. Acta*, 320, p.529-534.
- [17] MEIER, H., KUMARAN, S., FORMISYN, P., TRAN-MINH, C., Rapid Determination of Penicillin-V by FIA Using Fast Responding Enzyme Glass Electrodes in Different

Detection-Cell Configurations, *3rd Int. Symp. on Pharm. & Biomed. Analysis*, Boston, U.S.A., 28 April - 1 May, 1991.

- [18] GUILBAULT, G.G., HRABANKOVA, E., 1970, An Electrode for Determination of Amino Acids, *Anal. Chem.*, 42, p.1779-1783.
- [19] GUILBAULT, G.G., HRABANKOVA, E., 1971, New Enzyme Electrode Probes for D-Amino Acids and Asparagine, *Anal. Chim. Acta*, 56, p.285-290.
- [20] BLAEDEL, W.J., ENGSTROM, R.C., 1980, Reagentless Enzyme Electrodes for Ethanol, Lactate and Malate, *Anal. Chem.*, 52, p.1691-1697.
- [21] CLARK, L.C. Jr., 1972, A Family of Polarographic Enzyme Electrodes and the Measurement of Alcohol, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 3, p.377-394.
- [22] VERDUYN, C., VAN DIJKEN, J.P., SCHEFFERS, W.A., 1983, A Simple Sensitive and Accurate Alcohol Electrode, *Biotechnol. Bioeng.*, 25, p.1049-1055.
- [23] SHINBO, T., SUGIURA, M., KAMO, N., 1979, Potentiometric Enzyme Electrode for Lactate, *Anal. Chem.*, 51, 1, p.100-104.
- [24] MIZUTANI, F., YAMANAKA, T., TANABE, Y., TSUDA, K., 1985, An Enzyme Electrode for L-Lactate, With a Chemically Amplified Electrode, *Anal. Chim. Acta*, 177, p.153-166.
- [25] BARDELETTI, G., SECHAUD, F., COULET, P.R., 1986, A Reliable L-Lactate Electrode With a New Membrane for Enzyme Immobilisation for Amperometric Assay of Lactate, *Anal. Chim. Acta*, 187, p.47-54.
- [26] FATIBELLO-FILHO, O., SULEIMAN, A.A., GUILBAULT, G.G., LUBRANO, G.J., 1988, Bionzymatic Electrode for the Determination of Aspartame in Dietary Products, *Anal. Chem.*, 60, p.2397-2399.
- [27] HALL, G.F., BEST, D.J., TURNER, A.P.F., 1988, Amperometric Enzyme Electrode for the Determination of Phenols in Chloroform, *Enzyme Microb. Technol.*, 10, p.543-546.
- [28] KOJI, S., TAMIYA, E., KARUBE, I., KAMEDA, Y., 1989, Amperometric determination of Free Fatty Acids by Utilizing Five Sequential Enzyme Reactions, *Electroanalysis*, p.69-74.
- [29] FREW, J.E., BAYLIFF, S.W., GIBBS, P.N.B., GREEN, M.G., 1989, Amperometric Biosensor for the Rapid determination of Salicylate in Whole Blood, *Anal. Chim. Acta*, 224, p.39-46.
- [30] TRAN-MINH, C., EL YAMANI, H. 1988, Enzyme Sensors for Determination of Toxic Chemicals in Environmental Samples, in *Electrochemical Detection Techniques in the Applied Biosciences*, Ed. Junter, G.A., Ellis Horwood, vol. 2, p.131-141.
- [31] TRAN-MINH, C., BEAUX, J., 1979, Enzyme Electrodes for Inhibitors Determination : Urease-Fluoride System, *Anal. Chem.*, 51,1, p.91-95.
- [32] KUMARAN, S., TRAN-MINH, C., Evaluation de la Toxicité des Eaux par Biocapteur, *Journées d'Etudes: Electrochimie et Environnement*, Gif-sur-Yvette, Paris, 17 - 18 April 1991.

- [33] DURAND, P., NICAUD, J.M., MALLEVIALLE, J., 1984, Detection of Organophosphorous Pesticides With an Immobilized Cholinesterase Electrode, *J. Anal. Toxicol.*, 8, p.112-117.
- [34] TRAN-MINH, C., KUMARAN, S., Comparative Study of Different Immobilisation Techniques Suitable for Inhibitor determination, *Biosensors '90*, Singapore, May 2-4, 1990.
- [35] TRAN-MINH, C., GUYONNET, R., 1978, Capteur Enzymatique pour la Détection et la Dosage en Continu de Substances Toxiques, *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 286, Série C, p.357-359.
- [36] EL YAMANI, H., 1987, Mesure de la Toxicité de Polluants par Biocapteur. Réalisation d'une Electrode à Butyrylcholinestérase. Automatisation de la Détection de Pesticides, *Thèse*, Ecole des Mines de Paris.
- [37] TRAN-MINH, C., PANDEY, P.C., KUMARAN, S., 1990, Studies on Acetylcholine Sensor and its Analytical Application Based on the Inhibition of Cholinesterase, *Biosensors & Bioelectronics*, 5, p.461-471.
- [38] TRAN-MINH, C., KUMARAN, S., Biosensor for the Assessment of Aquatic Toxicity, *Biosensors '90*, Singapore, May 2-4, 1990.
- [39] CHATONNET, A., LOCKRIDGE, O., 1990, Comparison of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase, *Biochem. J.*, 260, p.625-634.
- [40] STYER, L., 1975, Excitable Membranes in Biochemistry, Ed. W.H. Freeman & Co., San Francisco, p.787-806.
- [41] FUKUTO, T.R., 1990, Mechanism of Action of Organophosphorous and Carbamate Insecticides, *Environ. Health Perspectives*, 87, p.245-254.
- [42] ALDRIDGE, A. N., DAVISON, A. N., 1952, The Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Tri-Esters of Phosphoric Acid, *Biochem. J.*, 51, p.61-70.
- [43] WILSON, I. B., HATCH, M. A., GINSBURG, S., 1960, Carbamylation of Acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.*, 235, p.2312-2315.
- [44] DAHL, W. N., HOLM, A. M. R., SCHRODER, K. H., 1977, The Potentiometric Determination of Insecticides, Part I. Organophosphorous Insecticides Inhibiting Cholinesterase, *Anal. Chim. Acta*, 93, p.91-97.
- [45] MORGAN, W. S. G., KUHN, P. C., VAN NIEKERK, P. P., 1984, Continuous Automatic Detection of Organophosphorous and Carbamates in Water Utilizing Enzyme Microcalorimetry, *Wat. Sci. Tech.*, 17, p.855-865.
- [46] HAMMOND, P. S., FORSTER, J. S., 1990, A Microassay-Based Procedure for Measuring Low Levels of Toxic Organophosphorous Compounds Through Acetylcholinesterase Inhibition, *Anal. Biochem.*, 180, p.380-383.
- [47] DAVIES, D. R., GREEN, A. L., 1956, The Kinetics of Reactivation, by Oximes, of Cholinesterase Inhibited by Organophosphorous Compounds, *Biochem. J.* 63, p.529-535.

- [48] CHILDS, A. F., DAVIES, D. R., GREEN, A. L., RUTLAND, J. P., 1955, The Reactivation by Oximes and Hydroxamic Acids of Cholinesterase Inhibited by Organophosphorous Compounds, *Brit. J. Pharmacol.*, 10, p.462-465.
- [49] ALDRIGE, W. N., DAVINSON, A. N., 1953, *Biochem. J.*, 55, p.763.
- [50] ALDRIGE, W. N., 1954, *Chem. and Ind.*, p.473.
- [51] WILSON, I. B., 1951, *J. Biol. Chem.*, 190, p.110.
- [52] WILSON, I. B., 1952, *J. Biol. Chem.*, 199, p.113.
- [53] TRAMMEL, A. M., SIMMONS, J. E., BORCHARDT, R. T., 1984, An Efficient In Vitro Assay for Acetylcholinesterase Reactivators Using Immobilized Enzyme, *Pharm Res.*, p.115-120.
- [54] HOVANEC, J. W., BROOMFIELD, C. A., STEINBERG, G. M., LANKS, K. W., LIESKE, C. N., 1977, Spontaneous Reactivation of Acetylcholinesterase Following Organophosphate Inhibition - An Analysis of Anomalous Reactivation Kinetics, *Biochem. Biophys. Acta*, 483, p.312-319.
- [55] BARTLETT, P. N., Conducting Organic Salts, in Biosensors - A Practical Approach, Ed. A.E.G. Cass, IRL Press, 1990, Ch. 3, p.47-94.
- [56] FREEMAN, A., AHARONOWITZ, 1981, Immobilization of Microbial Cells in Crosslinked Prepolymerized, Linear Polyacrylamide Gels : Antibiotic Production by Immobilized *Streptomyces clavuligerus* Cells, *Biotech. Bioeng.*, 23, p.2747-2759.
- [57] JAEGER, C. D., BARD, A. J., 1979, *J. Amer. Chem. Soc.*, 101, p.1690-1699.
- [58] MORELIS, R. M., COULET, P. R. 1990, Sensitive Biosensor for Choline and Acetylcholine Involving Fast Immobilization of a Bienenzyme System on a Disposable Membrane, *Anal. Chim. Acta*, 231, p.27-32.
- [59] A.R.M.I.N.E.S., Capteur à Enzymes et Procédé de Fabrication de Supports Enzymatiques pour ces Capteurs, *Brevet*, France, ARM-FR-8, 1986.
- [60] GRUBB, W. T., KING, L. H., 1980, Palladium and Palladium Oxide pH electrodes, *Anal. Chem.*, 52, p.270-273.
- [61] BORDI, S., CARLA, M., PAPESCHI, G., 1984, Iridium/Iridium Oxide Electrode for Potentiometric Determination of Proton Activity in Hydroorganic Solutions at Sub-Zero Temperatures, *Anal. Chem.*, 56, p.317-319.
- [62] IANIELLO, R. M., YACYNYCH, A. M., 1983, Urea Sensor Based on Iridium Dioxide Electrodes With Immobilized Urease, *Anal. Chim. Acta.*, 146, p.249-253.
- [63] TRAN-MINH, C., KUMARAN, S., MALIK, A., EL YAMANI, H., Pd/PdO Based Urea and Butyrylcholine Microbiosensors, *Anabiotec '90*, 3rd Intl. Symposium on Analytical Methods and Problems in Biotechnology, Burlingame, San Francisco, U.S.A., 22 - 24 Oct. 1990.

- [64] ABDUL, M. A., 1987, Etude du Greffage d'Enzymes sur des Supports Inorganiques en Oxyde de Nickel et Oxydes de Silicium. Réalisation d'un Capteur Enzymatique à Base d'une Electrode Palladium/Oxyde de Palladium, *Thèse*, INP Grenoble et ENSM St-Etienne.
- [65] RICHARDS, F. M., KNOWLES, J. R., 1968, Glutaraldehyde as a Protein Cross-linking Agent, *J. Mol. Biol.*, 37, p.231-233.
- [66] PIODA, L. A. R., WACHTER, R. E. D., SIMON, W., 1967, Komplexe von Nonactin Mit Natrium-, Kalium- und Ammonium-Ionen, *Hel. Chim. Acta.*, 50, p.1373-1376.
- [67] GUILBAULT, G. G., NAGY, G., KUAN, S. S., 1973, An Improved Electrode for the Assay of Urea in Blood, *Anal. Chim. Acta.*, 67, p.195-201.
- [68] GUILBAULT, G. G., NAGY, 1973, Improved Urea Electrode, *Anal. Chem.*, 45, p.417-419.
- [69] PANDEY, P. C., TRAN-MINH, C., KUMARAN, S., LANTREIBECQ, F., 1991, Purification of Urease From the Seeds of *Cajanus Cajan* and the Construction of a Sensor for the Analysis of Urea in Human Serum, *Indian J. of Tech.*
- [70] MC KENNA, K., TOTH, A. B., 1987, Tetrathiafulvalene Tetracyanoquinodimethane Xanthine Oxidase Amperometric Electrode for the Determination of Biological Purines, *Anal. Chem.*, 59, p.954-958.
- [71] HENDRY, S. P., TURNER, A. P. F., 1988, A Glucose Sensor Utilising Tetracyanoquinodimethane as a Mediator, *Hormone & Metabolic Research Supplement Series*, 20, p.37-40.
- [72] TRAN-MINH, C., 1985, Immobilised Enzyme Probes for Determining Inhibitors, *Ion-Selective Electrode Rev.*, 7, p.41-75.
- [73] MATTOCK, 1961, pH Measurement and Titration, Heywood & Co. Ltd., London, p.87.
- [74] ALEXANDER, P. W., JOSEPH, J. P., 1981, A Coated Metal Enzyme Electrode for Urea Determinations, *Anal. Chim. Acta.*, 131, p.103-109.
- [75] KUMARAN, S., TRAN-MINH, C., 1992, Insecticide Determination With Enzyme Electrodes Using Different Enzyme Immobilisation Techniques, *Electroanalysis*, (sous presse).
- [76] GUILBAULT, G. G., MONTALVO, J. G., 1970, An Enzyme Electrode for the Substrate Urea, *J. Amer. Chem. Soc.*, 92, p.2533-2538.
- [77] SUAUD-CHAGNY, M. F., PUJOL, J. F., 1985, Micro-Electrode à Enzyme Immobilisée pour la Détection de l'Acétylcholine, *Analisis*, 13, p.25-29.
- [78] BRADLEY, C. R., RECHNITZ, G. A., 1984, Kinetic Analysis of Enzyme Electrode Response, *Anal. Chem.*, 56, p.664-667.
- [79] MULLEN, W. H., CHURCHHOUSE, S. J., VADGAMA, P. M., 1985, Enzyme Electrode for Glucose Based on the Quinoprotein Glucose Dehydrogenase, *Analyst*, 110, p.925-928.
- [80] CULLEN, L. F., RUSLING, J. F., SCHLEIFER, A., PAPARIELLO, G. J., 1974, Improved Penicillin Selective Enzyme Electrode, *Anal. Chem.*, 46, p.1955-1961.

- [81] MATSUMOTO, K., SEJO, H., KARUBE, I., SUZUKI, S., 1980, Amperometric Determination of Choline With Use of Immobilized Choline Oxidase, *Biotech. Bioeng.*, 22, p.1071-1086.
- [82] KUMARAN, S., MEIER, H., DANNA, A. M., TRAN-MINH, C., 1991, Immobilization of Thin Enzyme Membranes to Construct Glass Enzyme Electrodes, *Anal. Chem.* 63, p.1914-1918.
- [83] TRAN-MINH, C., KUMARAN, S., MEIER, H., DANNA, A.M. 1990, Immobilisation des Protéines, *Brevet* F-9011630.
- [84] MEIER, H., KUMARAN, S., DANNA, A. M., TRAN-MINH, C., 1991, Rapid Measurement of Penicillin Contained in Complex Mediums by Enzyme Loaded Glass Electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 249, p.405-411.
- [85] BEAUX, J., 1983, Etude du Comportement des Enzymes Immobilisées par Capteurs Enzymatiques. Activités Catalytiques et Phénomènes d'Inhibition. Analyse Mathématique et Applications Analytiques, *Thèse*, INP et l'Univ.Scientifique et Médicale, Grenoble .
- [86] BRADY, J. E., CARR, P. W., 1980, Theoretical Evaluation of the Steady-State Response of Potentiometric Enzyme Electrodes, *Anal. Chem.*, 52, p.977-980.
- [87] RUZICKA., J., CHRISTIAN, G. D., 1990, Flow Injection Analysis and Chromatography: Twins or Siblings?, *Analyst*, 115, p.475-486.
- [88] ROSARIO, S. A., CHA, G. S., MEYERHOFF, M. E., 1990, Use of Ionomer Membranes to Enhance the Selectivity of Electrode-Based Biosensors in Flow Injection Analysis, *Anal. Chem.*, 62, p.2418-2424.
- [89] NARAINESINGH, D., MUNGAL, R., NGO, T. T., 1990, Flow Injection Analysis of Serum Urea Using Urease Covalently Immobilized on 2-Fluoro-1-Methylpyridinium Salt-Activated Fractogel and Fluorescence Detection, *Anal. Biochem.*, 188, p.325-329.
- [90] KIBA, N., TAGAMI, H., FURUSAWA, M., 1990, Determination of L-Alanine in a Flow Injection Analysis System With an Immobilized Enzyme Reactor, *Anal. Chim. Acta*, 239, p.307-310.
- [91] YAO, T., MATSUMOTO, Y., 1989, An Electroanalytical Method for Estimation of Fish Freshness Using a Flow Injection System With Some Immobilized Enzyme Reactors, *Electroanalysis*, 1, p.173-176.
- [92] JARDIM, W. F., PASQUINI, C., GUIMARAES, J. R., DE FARIA, L. C., 1990, Short-Term Toxicity Test Using *Escherichia Coli*: Monitoring CO₂ Production by Flow Injection Analysis, *Wat. Res.*, 24, p.351-354.
- [93] HINKAMP, S., SCHWEDT, G., 1990, Determination of Total Phosphorous in Waters With Amperometric Detection by Coupling of Flow-Injection Analysis With Continuous Microwave Oven Digestion, *Anal. Chim. Acta*, 236, p.345-350.
- [94] ALEGRET, S., ALONSO, J., BARTROLI, J., DEL VALLE, M., 1990, Flow-Through pH-ISFET as Detector in the Determination of Ammonia, *Anal. Chim. Acta*, 231, p.53-58.
- [95] KUMARAN, S., TRAN-MINH, C., 1992, Determination of Organophosphorous and Carbamate Insecticides by Flow Injection Analysis, *Anal. Biochem.*, (sous presse)

- [96] VALERO, F., LAFUENTE, J., POCH, M., SOLA, C., 1990, Biomass Estimation Using On-Line Glucose Monitoring by Flow Injection Analysis, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25, p.591-602.
- [97] APPELQVIST, R., HANSEN, E. H., 1990, Determination of Glucose in Fermentation Processes by Means of an On-Line Coupled Flow Injection System Using Enzyme Sensors Based on Chemically Modified Electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 235, p.265-271.
- [98] DE CASTRO, M. D. L., VALCAREL, M., 1989, Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 7, p.1291-1300.
- [99] VAN OPSTAL, M. A. J., WOLTERS, R., BLAUW, J. S., VAN KRIMPEN, P. C., VAN BENNEKOM, W. P., BULT, A., 1990, Determination of Penicillin in Pharmaceutical Formulations by Flow Injection Analysis Using an Optimised Immobilised Penicillinase Reactor and Iodometric Detection, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 8, p.49-60.
- [100] BURGUERA, J. L., BURGUERA, M., 1986, Determination of Some Organophosphorous Insecticides by Flow Injection With a Molecular Emission Cavity Detector, *Anal. Chim. Acta*, 179, p.497-502.
- [101] YANEZ-SEDENO, P., NOVA NOVA, C., POLO DIEZ, L. M., 1988, Spectrophotometric Determination of Carbaryl by Flow Injection Analysis, *Microchem. J.*, 38, p.370-375.
- [102] KINDERVATER, R., KUNNECKE, W., SCHMID, R. D., Exchangeable Immobilized Enzyme Reactor for Enzyme Inhibition Tests in Flow-Injection Analysis Using a Magnetic Device. Determination of Pesticides in Drinking Water, *Anal. Chim. Acta*, 234, p.113-117.
- [103] LEON-GONZALEZ, M. E., TOWNSHEND, A., 1990, Flow-Injection Determination of Paraoxon by Inhibition of Immobilized Acetylcholinesterase, *Anal. Chim. Acta*, 236, p.267-272.
- [104] GNANASEKARAN, R., MOTTOLA, H., 1985, Flow Injection Determination of Penicillins Using Immobilized Penicillinase in a Single Bead String Reactor, *Anal. Chem.*, 57, p.1005-1009.
- [105] ROBINSON, P. J., DUNHILL, P., LILLY, M. D., 1971, Porous Glass as a Solid Support for Immobilisation or Affinity Chromatography of Enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, 242, p.659-661.
- [106] Concise Encyclopedia Biochemistry, 1988, *Walter Gruyter*, 2^e Edition, p.79-80.
- [107] CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1987-88, *CRC Press Inc.* 68^e Edition, F142.

ANNEXE

Aperçu du programme "FindAlfa.pas."

L'objectif de ce programme est de calculer le paramètre α en connaissant les valeurs de K_M et de C_S^1 , déterminées expérimentalement. L'algorithme est basé sur de simples équations différentielles de bilan du substrat et du produit [86] dans la couche enzymatique de l'électrode (§ 3.2.5). Puisqu'une simple solution analytique de ces équations n'existe toujours pas, une solution numérique est recherchée. Le programme que nous présentons est basé sur quelques étapes de calcul indiquées par son organigramme et son listing.

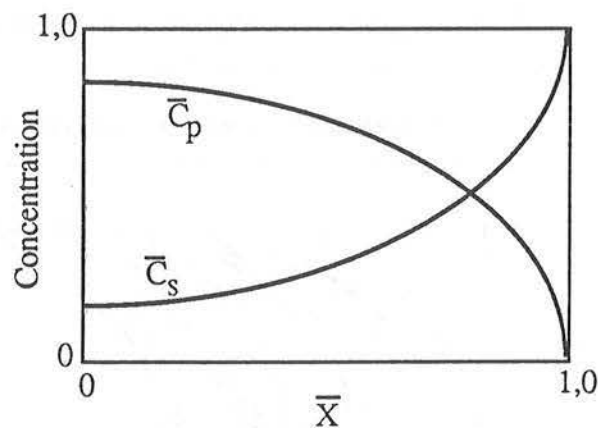
Procédure A

Détermination de profils de concentrations du substrat et du produit dans la couche enzymatique

procédures principales : Modified_secant_FindCsO / InitialCond2ndOrder

entrée : C_S^0 , K_M , α GUESS sortie : $C_P \big|_{x=0}$

Comme les équations différentielles de deuxième ordre possèdent des conditions aux bornes de type mixte (équations 1 à 4, § 3.2.5.8), une solution de tir est employée pour les résoudre ; la solution de ces équations est calculée par la méthode de Runge-Kutta de 4^e ordre pour une valeur donnée de la concentration du substrat sur la surface de l'électrode ($C_S \big|_{x=0}$) - une méthode sécante est ensuite employée afin de rechercher la valeur correcte de $C_S \big|_{x=0}$, en comparant la concentration du substrat du milieu (C_S^0) avec sa valeur réelle.



Procédure B

Calcul de la concentration limite du substrat C_S^1 à partir des courbes de réponse Nernstiennes

procédure principale : Calc_Cls

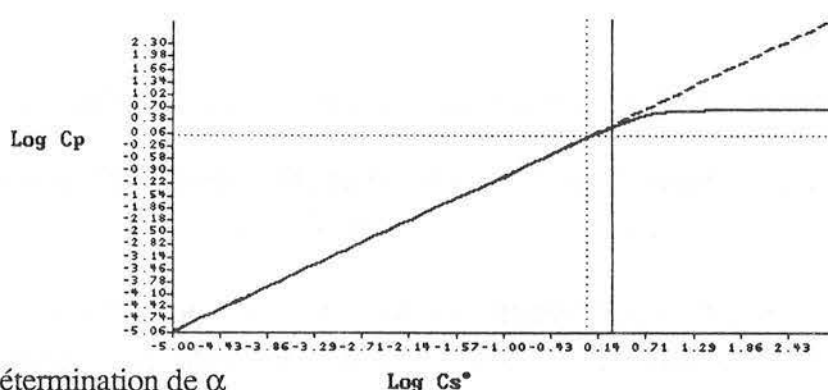
entrée : α GUESS, K_M sortie : C_S^1 .

Plusieurs valeurs de C_S^0 (normalement 51) sont utilisées pour effectuer le calcul des concentrations du produit sur la surface de l'électrode. A partir de celles-ci, la courbe de réponse Nernstienne ($\log C_S^0$ en fonction de $\log C_P \big|_{x=0}$) peut être tracée. Une telle courbe est caractérisée

par une partie linéaire à des concentrations faibles de C_S^0 ; la partie de la courbe où la réponse devient non-linéaire est repérée par un calcul de la pente locale de cette courbe et en faisant la comparaison entre celle-ci et la valeur de consigne choisie par l'utilisateur. La régression linéaire est utilisée pour calculer la pente de cette ligne et l'interpolation donne la valeur de C_S^1 recherchée.

Calibration curve calculated from concentration profiles :

Alpha : 7.4188 Km : 1.2000 ml Last log Cp = 0.6475 log CIs = 0.3010



Détermination de α

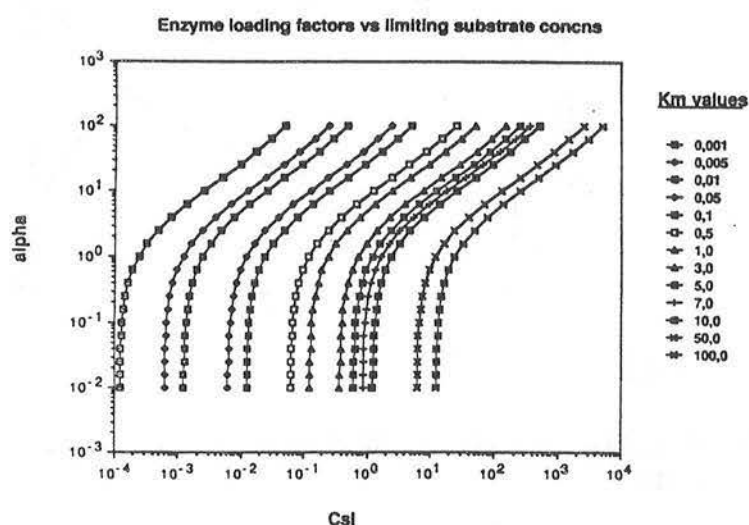
Log Cs*

procédure principale : Modified_secant_FindAlpha

entrée : C_S^1 , K_M

sortie : α

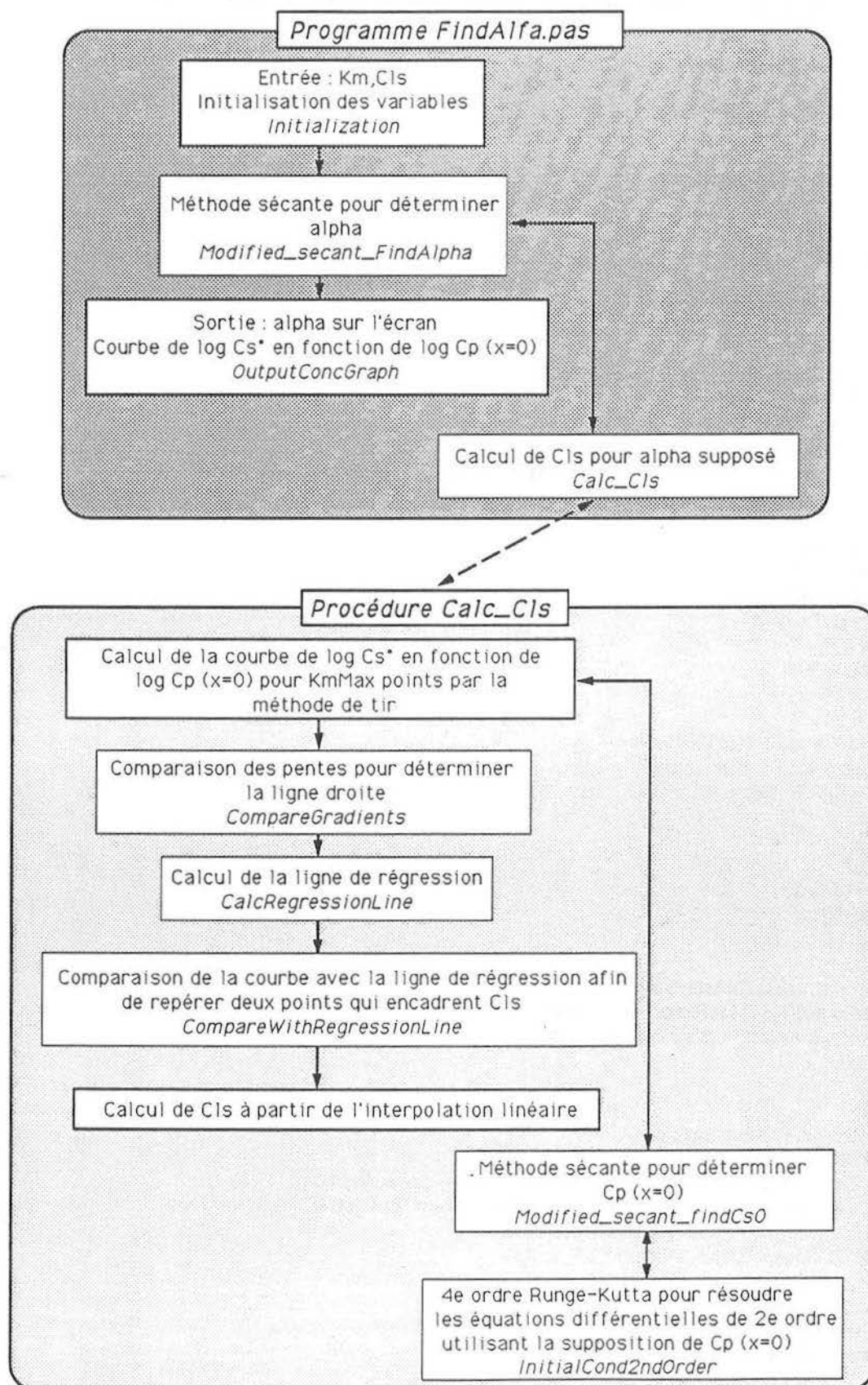
Utilisant les procédures A et B, une routine de recherche basée sur la méthode de sécante suppose une valeur de α avant de calculer la concentration C_S^1 . La valeur de C_S^1 ainsi calculée est comparée avec la valeur réelle de C_S^1 , avant que α soit modifié et le calcul soit repris, jusqu'à ce que la valeur de C_S^1 calculée soit égale à la valeur de C_S^1 donnée.



La marche du programme

Ce programme est démarré sur un ordinateur Amstrad 20386 compatible PC équipé d'un processeur 80386 à 20 MHz et un coprocesseur numérique 80387. Le temps de calcul est de l'ordre de 3 minutes.

Organigramme du programme "FindAlfa.pas"




```

{PRIMARY FILE : "FindAlfa.PAS"}

{uses include files : "RK2.INC" , "SEC5B.INC" and "SEC5B.INC"}

{*****}

program FindAlfa;

{use numeric coprocessor;}
{$N+}

{set stack and heap sizes;}
{$M 40000, 0, 655360}

{graphics library;}
uses
  Dos, Crt, Gdriver, Gkernel, Gshell, Gwindow;

const
  dir = 'C:\George\PASCAL\enzyme\enzconc';
  TNNearlyZero = 1E-015;
  SecTol=1E-5; MaxIter=101;
  TNArraySize = 50;           { Maximum size of vectors }
  MaxFuncs = 10;              { Maximum number of user defined functions }
  LowerLimit = 0;
  UpperLimit = 1;
  InitialDeriv = 0;
  NumReturnTable = 10;
  NumReturnGraph = 50;
  NumIntervals1 = 100;
  Cs0real = 1.0;
  IterMaxBis = 501;
  TolBis = 1.0E-5;
  KmMax = 51;                  {<= KmMax should be 11,21,...,51}
  KmXloglow = -5.0; KmYloglow = -4.00;
  KmXloghigh = 3.0; KmYloghigh = 2.00;
  slopetol = 0.001; nonlintol = 0.05;

  LLA=0.01;
  ULA=10.0;
  TolBisA=1.0E-5;
  MaxiterA=101;

type
  TNvector = array[0..TNArraySize] of extended;
  FuncVect = array[1..MaxFuncs] of Pointer;
  CsBulkArrtype = array[1..KmMax] of extended;

var
  Ist : text;
  Search_method, OutPut, ans : char;
  Error : byte;
  IntMed, ConstLine, SlopeLine, CsGuess, Km, Kmdim, alpha, slopediff,
    Ydiff, Cls, Yreal, YLR, SumX, SumY, SumXX, SumXY, Cs0log,
    real_Cls, Cs0dim, A2, B2, Aguess : Extended;
  XValues, CsValues, CsDerivValues : TNvector;
  itabs, nlf, nonlinflag, j, k, i, NumReturn, NumIntervals : integer;
  PlotConc : plotarray;
  slope, CsX0, CpX0, CsBulkArr, CsBulkArr1 : CsBulkArrType;
  nonlinfound : boolean;

{*****}

```

```
function KineticEqn (X : extended; Cs : extended; CsPrime : extended) : extended;
```

```
    {corresponding variables in "RK2.INC" :
```

```
        T : extended;
        X : extended;
        XPrime : extended}
```

```
{-----}
{-      This is the second order differential equation      -}
{-----}
```

```
begin
```

```
    KineticEqn := alpha * Km * Cs / (Km+Cs);
end;
```

```
{*****}
```

```
{$I RK2.INC}
```

```
{*****}
```

```
Function Cs0_calc (var CsGuess : extended) : extended;
```

```
begin
```

```
    Error := 0;
```

```
    {corresponding variables in "RK2.INC" :
```

```
        InitialValue : Extended;
    var TValues       : TNvector;
    var XValues       : TNvector;
    var XDerivValues  : TNvector;
    var Error         : byte;}
```

```
    InitialCond2ndOrder(CsGuess, XValues, CsValues, CsDerivValues, Error);
```

```
    If (error<>0) then
```

```
    begin
```

```
        Clrscr;
```

```
        writeln ('Data input error - program terminated :');
```

```
        case Error of
```

```
            1 : Writeln('The number of values to return must be',
                        'greater than zero.');
```

```
            2 : begin
```

```
                Writeln('The number of intervals must be greater than');
```

```
                Writeln('or equal to the number of values to return.');
```

```
            end;
```

```
            3 : Writeln('The lower limit must be different ',
                        'from the upper limit.');
```

```
        end; { case }
```

```
        halt;
```

```
    end;
```

```
    Cs0_calc := CsValues [NumReturn];
```

```
end;
```

```
{*****}
```

```
{$I SEC5B.INC}
```

```
{*****}
```

```
Procedure DataInput;
```

```

begin
  ClrScr;
  GotoXY (10,2); Writeln ('Ez5B.pas');
  GotoXY (10,3); Writeln ('=====');

  GotoXY (10,5); Writeln ('Cls(mM) : ');
  GotoXY (10,6); Writeln ('Km (mM) : ');

  GotoXY (20,5); Readln (real_Cls);
  real_Cls := ln(real_Cls)/ln(10);
  GotoXY (20,6); Readln (KmDim);

  GotoXY (10,8); Writeln ('Kmbar      : ');
  GotoXY (10,9); Writeln ('Km iteration : ');
  GotoXY (10,10); Writeln ('Iteration   : ');
  GotoXY (10,11); Writeln ('Cs (X=0) guess : ');
  GotoXY (10,12); Writeln ('Cs-(real)-Cs-(calc) (      )');

  GotoXY (10,20); Writeln ('Iter Alpha      : ');
  GotoXY (10,21); Writeln ('Alpha           : ');
  GotoXY (10,22); Writeln ('Cls(real)-Cls(calc) : ');
end;

[*****]

procedure OutputConcFile;

var
  i : integer;

begin
  Assign (lst, dir+'Xvals.dat');
  rewrite (lst);
  for i := 0 to Numreturn do
    writeln(lst,XValues[i]);
  close (lst);

  Assign (lst, dir+'Csvals.dat');
  rewrite (lst);
  for i := 0 to Numreturn do
    writeln(lst,CsValues[i]);
  close (lst);

  Assign (lst, dir+'Csdvals.dat');
  rewrite (lst);
  for i := 0 to Numreturn do
    writeln(lst,CsDerivValues[i]);
  close (lst);
end;

[*****]

procedure OutputConcGraph;

procedure DrawXlines (Xnum:integer);
begin
  for i := 1 to 5 do
    begin
      if Xnum = 0 then
        for j := 1 to 4 do
          plotconc[j,1] := KmXloglow + i
        else
          for j := 1 to 4 do

```

```

        plotconc[j,1] := KmXloglow + (i-1) + ln(Xnum)/ln(10);
    for j := 1 to 3 do
        plotconc[j,2] := KmYloglow + j-1;
    plotconc[4,2] := KmYlogHigh+0.52;
    SelectWorld(1); SelectWindow(1);
    resetaxis;
    SetLinestyle (1);
    DrawPolygon (PlotConc, 1,4, 0, 1, 0);
end;
end;

```

```

procedure DrawYlines (Ynum:integer);
begin
    for i := 1 to 6 do
        begin
            if Ynum = 0 then
                for j := 1 to 4 do
                    plotconc[j,2] := KmYloglow + i
                else
                    for j := 1 to 4 do
                        plotconc[j,2] := KmYloglow + (i-1) + ln(Ynum)/ln(10);
                    for j := 1 to 3 do
                        plotconc[j,1] := KmXloglow + j-1;
                    plotconc[4,1] := KmXlogHigh+0.38;
                    SelectWorld(1); SelectWindow(1);
                    resetaxis;
                    SetLinestyle (1);
                    DrawPolygon (PlotConc, 1,4, 0, 1, 0);
                end;
            end;
        end;
    end;
end;

```

```

procedure DrawClsXline;
begin
    for i := 1 to KmMax do
        begin
            plotconc[i,1] := Cls;
            plotconc[i,2] := constline + slopeline * CsBulkArr[i];
        end;
    end;
    SelectWorld(1); SelectWindow(1);
    resetaxis;
    SetLinestyle (2);
    DrawPolygon (PlotConc, 1,KmMax, 0, 1, 0);
end;

```

```

begin
    InitGraphic;

    DefineWindow(1,10,100,68,300);

    for i := 1 to KmMax do
        begin
            plotconc[i,1] := CsBulkArr[i];
            plotconc[i,2] := constline + slopeline * CsBulkArr[i];
        end;

    FindWorld (1,Plotconc, KmMax, 1.0, 1.0);
    SelectWorld(1); SelectWindow(1); SetLinestyle (2);
    DrawAxis (9,9,0,0,0,0,1,1,false);
    DrawPolygon (PlotConc, 1,KmMax, 0, 1, 0);
    DrawClsXline;
    resetaxis; SetLinestyle (0);
    for i := 1 to KmMax do
        begin

```

```

    plotconc[i,1] := CsBulkArr[i];
    plotconc[i,2] := CpX0[i];
end;

DrawPolygon (PlotConc, 1,KmMax, 0, 1, 0);

gotoXY(2,2); writeln('Calibration curve calculated from ',
                    'concentration profiles : ');
gotoXY(2,3); writeln('-----',
                    '-----');
gotoXY(2,5); writeln('Alpha : ',alpha:8:4,' Km : ',KmDim:8:4,' mM',
                    ' Last log Cp = ',plotconc[KmMax,2]:8:4,' log Cls = ',
                    Cls:8:4);

gotoXY(2,13); writeln('Log Cp');
gotoXY(32,23); writeln('Log Cs');

ans := upcase(readkey);
case ans of
    'E' : halt;
    'P' : hardcopy (false, 0);
end;

leavegraphic;
end;

{*****}

procedure CompareGradients;

begin
    k:=1;
    repeat
        k := k+1;
        slopediff := slope[k-1]-slope[k];
        if (slopediff >= slopetol) then
            begin
                nonlinflag := k;
                exit;
            end;
    until (k=KmMax);

    Clrscr; GotoXY (5,5);
    writeln('I : curve linear');
    ans := readkey;
end;

{*****}

procedure CompareWithRegressionLine;

begin
    k := 1;
    while (k < KmMax) do
        begin
            k := k+1;
            Yreal := CpX0[k];
            YLR := constline + slopeline * CsBulkArr[k];
            Ydiff := YLR-Yreal;
            if (Ydiff >= NonLinTol) then
                begin
                    nonlinflag := k;
                    exit;
                end;
        end;
    end;
end;

```

```

    end;
end;

GotoXY (5,7);
writeln('II : curve linear');
ans := readkey;
end;

{*****}

procedure CalcRegressionLine;

begin
    SumX:=0.0;
    SumY:=0.0;
    SumXX:=0.0;
    SumXY:=0.0;
    for k := 1 to nonlinflag-1 do
        begin
            SumX := SumX + CsBulkArr[k];
            SumXX := SumXX + CsBulkArr[k] * CsBulkArr[k];
            SumY := SumY + CpX0[k];
            SumXY := SumXY + CsBulkArr[k] * CpX0[k];
        end;

    nlf:=nonlinflag-1;
    Intmed := nlf * sumXX - SumX * SumX;
    slopline := (nlf * SumXY - SumX * SumY)/IntMed;
    constline := (SumY * SumXX - SumX * SumXY)/IntMed;
end;

{*****}

procedure FindCls;

begin
    for k:= 2 to KmMax do
        slope[k-1] := (CpX0[k] - CpX0[k-1])/(CsBulkArr[k] - CsBulkArr[k-1]);

    CompareGradients;
    CalcRegressionLine;
    CompareWithRegressionLine;

    nlf := nonlinflag;

    {linear interpolation on real curve between pts nlf-1 and nlf : }
    A2 := (CpX0[nlf]-CpX0[nlf-1])/(CsbulkArr[nlf] - CsbulkArr[nlf-1]);
    B2 := CpX0[nlf] - CsbulkArr[nlf]*A2;

    Cls := (B2 - constline + 0.05)/ (slopline-A2);

end;

{*****}

procedure Initialization;

begin
    NumIntervals := NumIntervals1;
    NumReturn := NumReturnGraph;
    for i := 1 to KmMax do
        CsBulkArr1[i] := exp( (KmXloglow+(KmXloghigh-KmXloglow)/
            (KmMax-1)*(i-1)) * ln(10));

```

end;

{*****}

function Calc_Cls (rootA:extended):extended;

begin

ItAbs := ItAbs+1;

GotoXY (34,20); Writeln (ItAbs:3);

GotoXY (34,21); Writeln (rootA:12);

Alpha := rootA;

for k := 1 to KmMax do

begin

Km := Kmdim/CsBulkArr1[k]; {<== Km/Cs=Kmbar}

GotoXY (34,8); writeln (Km:12);

GotoXY (34,9); Writeln (k:3);

Modified_secant_findCs0;

CsX0[k] := Csguess;

end;

for i := 1 to KmMax do

begin

CpX0[i] := ln(CsBulkArr1[i]-CsX0[i]*CsBulkArr1[i])/ln(10);

CsBulkArr[i] := ln(CsBulkArr1[i])/ln(10);

end;

FindCls;

Calc_Cls := Cls;

GotoXY (34,22); Writeln (Real_Cls-Cls:12,' ');

end;

{*****}

{**\$I SEC5B2.INC**}

{*****}

procedure OutputResults;

begin

Assign(lst,'CPCS0.AA4');

rewrite (lst);

writeln(lst,alpha);

writeln(lst,Km);

writeln(lst);

for i := 1 to KmMax do

writeln(lst,exp(CsBulkArr[i]*ln(10)));

writeln(lst);

for i := 1 to KmMax do

writeln(lst,exp(CpX0[i]*ln(10)));

close (lst);

end;

{*****}

begin

Itabs :=0;

DataInput;

```
Initialization;  
Modified_secant_FindAlpha;  
OutputResults;  
  
OutputConcGraph;  
end.
```

```
{*****}
```



```
{INCLUDE FILE: "SECANT.INC"}
```

```
{SEE PRIMARY FILE : "FindAlfa.PAS"}
```

```
{*****}
```

```
procedure Modified_Secant_findCs0;
```

```
var
```

```
Found : boolean;           { Flags that a root has been Found }
```

```
OldX, OldY, X, Y,
```

```
CsFunc, Value, Guess1, Guess2, NewX, NewY, UY, LY : extended;
```

```
error : byte;
```

```
iter : integer;
```

```
procedure Initial      (Guess1      : extended;
                        Guess2      : extended;
                        SecTol      : extended;
                        MaxIter     : integer;
                        var OldX     : extended;
                        var X        : extended;
                        var OldY     : extended;
                        var Y        : extended;
                        var Found    : boolean;
                        var iter     : integer;
                        var Error    : byte);
```

```
{-----}
{- Input: Guess1, Guess2, SecTol, MaxIter      -}
{- Output: OldX, X, OldY, Y, Found, iter, Error -}
{-                                             -}
{- This procedure sets the initial values of the above -}
{- variables. If OldY or Y is zero, then a root has been -}
{- Found and Found = TRUE. This procedure also checks -}
{- the tolerance (SecTol) and the maximum number of iterations -}
{- (MaxIter) for errors.                      -}
{-----}
```

```
begin:
```

```
Found := false;
```

```
iter := 0;
```

```
Error := 0;
```

```
OldX := Guess1;
```

```
X := Guess2;
```

```
OldY := Cs0Real - Cs0_Calc (OldX);
```

```
Y := Cs0Real - Cs0_Calc (X);
```

```
LY:=OldY;
```

```
UY:=Y;
```

```
if ABS(OldY) <= TNNearlyZero then      { OldX is the root }
```

```
begin
```

```
  X := OldX;
```

```
  Y := OldY;
```

```
  Found := true;
```

```
end
```

```
else
```

```
  if ABS(Y) <= TNNearlyZero then
```

```
    Found := true          { X is the root }
```

```
  else
```

```
    if ABS(OldY - Y) <= TNNearlyZero then
```

```
      Error := 2;          { Slope of line is zero; no intercept }
```

```
  if SecTol <= 0 then
```

```
    Error := 3;
```

```
  if MaxIter < 0 then
```

```

    Error := 4;
end; { procedure Initial }

begin { procedure Secant }
    GotoXY (34,12); Writeln ('      ');

    Guess1 := LowerLimit;
    Guess2 := UpperLimit;
    Initial(Guess1, Guess2, SecTol, MaxIter, OldX, X, OldY, Y,
        Found, iter, Error);
    while not(Found) and (Error = 0) and (iter<MaxIter) do
    begin
        GotoXY (34,10); Writeln (iter:3);
        iter := Succ(iter);
        NewX := X - Y * (X - OldX) / (Y - OldY);  { The secant formula }

        { * modification of secant method: }
        if (NewX>UpperLimit) then
            NewX := X - Y * (X - UpperLimit) / (Y - UY)
        else if (NewX<LowerLimit) then
            NewX := X - Y * (X - LowerLimit) / (Y - LY);

        GotoXY (34,11); Writeln (NewX:12);
        CsFunc := Cs0Real - Cs0_Calc (NewX);
        Found := (Abs(CsFunc) < SecTol);
        OldX := X;
        OldY := Y;
        X := NewX;
        Y := CsFunc;
        GotoXY (34,12); Writeln (Csfunc:12,' ');
    end;
    CsGuess := X;
    if not(Found) and (Error = 0) and (iter >= MaxIter) then
        Error := 1;
    case Error of
        1 : Writeln('It will take more than ',MaxIter,
            ' iterations to solve this equation. ');

        2 : Writeln('The slope is approaching zero. ');

        3 : Writeln('The tolerance must be greater than zero. ');

        4 : Writeln('The maximum number of iterations must be greater than zero. ');
    end;
end;

{ **** }

```

```
{INCLUDE FILE: "SEC5B2.INC"}
```

```
{SEE PRIMARY FILE : "FindAlfa.PAS"}
```

```
{*****}
```

```
procedure Modified_Secant_findalpha;
```

```
var
```

```
  Found_alpha : boolean;           { Flags that a root has been Found }
  OldXa, OldYa, Xa, Ya,
  ValA, ValueA, Guess1a, Guess2a, NewXa, NewYa, UYa, LYa : extended;
  ErrorA : byte;
  iterA : integer;
```

```
procedure Initial      (Guess1a      : extended;
                        Guess2a      : extended;
                        SecTol       : extended;
                        MaxiterA     : integer;
                        var OldXa     : extended;
                        var Xa       : extended;
                        var OldYa    : extended;
                        var Ya       : extended;
                        var Found_alpha : boolean;
                        var iterA    : integer;
                        var ErrorA   : byte);
```

```
{-----}
{- Input: Guess1a, Guess2a, SecTol, MaxiterA          -}
{- Output: OldXa, Xa, OldYa, Ya, Found_alpha, iterA, ErrorA -}
{- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -}
{- This procedure sets the initial values of the above -}
{- variables. If OldYa or Ya is zero, then a root has been -}
{- Found and Found_alpha = TRUE. This procedure also checks -}
{- the tolerance (SecTol) and the maximum number of iterations -}
{- (MaxiterA) for errors. -}
{-----}
```

```
begin
```

```
  Found_alpha := false;
  iterA := 0;
  ErrorA := 0;
  OldXa := Guess1a;
  Xa := Guess2a;
  OldYa := Real_Cls - Calc_Cls(OldXa);
  Ya := Real_Cls - Calc_Cls(Xa);
  LYa := OldYa;
  UYa := Ya;
  if ABS(OldYa) <= TNNearlyZero then      { OldXa is the root }
    begin
      Xa := OldXa;
      Ya := OldYa;
      Found_alpha := true;
    end
  else
    if ABS(Ya) <= TNNearlyZero then
      Found_alpha := true                { Xa is the root }
    else
      if ABS(OldYa - Ya) <= TNNearlyZero then
        ErrorA := 2;                    { Slope of line is zero; no intercept }
      if SecTol <= 0 then
        ErrorA := 3;
      if MaxiterA < 0 then
```

```

    ErrorA := 4;
end; { procedure Initial }

begin { procedure Secant }
    GotoXY (34,22); Writeln ( ' ----- ');

    Guess1a := LLA;
    Guess2a := ULA;
    Initial(Guess1a, Guess2a, SecTol, MaxiterA, OldXa, Xa, OldYa, Ya,
        Found_alpha, iterA, ErrorA);
    while not(Found_alpha) and (ErrorA = 0) and (iterA < MaxiterA) do
    begin

        iterA := Succ(iterA);
        NewXa := Xa - Ya * (Xa - OldXa) / (Ya - OldYa); { The secant formula }

{ modification of secant method:}
        if (NewXa > ULA) then
            NewXa := Xa - Ya * (Xa - ULA) / (Ya - UYa)
        else if (NewXa < LLA) then
            NewXa := Xa - Ya * (Xa - LLA) / (Ya - LYa);

        ValA := Real_Cls - Calc_Cls(NewXa);
        Found_alpha := (Abs(ValA) < SecTol);
        OldXa := Xa;
        OldYa := Ya;
        Xa := NewXa;
        Ya := ValA;
    end;
    AGuess := Xa;
    if not(Found_alpha) and (ErrorA = 0) and (iterA >= MaxiterA) then
        ErrorA := 1;
    case ErrorA of
        1 : Writeln('It will take more than ',MaxiterA,
            ' iterations to solve this equation. ');

        2 : Writeln('The slope is approaching zero. ');

        3 : Writeln('The tolerance must be greater than zero. ');

        4 : Writeln('The maximum number of iterations must be greater than zero. ');
    end;

    GotoXY (10,14); writeln ('alpha : ',AGuess:14);
    GotoXY (10,16); writeln ('Calculation finished : hit any Key to ',
        'continue... ');
    ans := readkey;

end;

{ **** }

```



```
Data = record
    T, X, xPrime : extended;
    Next : Ptr;
end;
```

```
var
    Values : Ptr;           { Pointer to the stack}
    Spacing, HalfSpacing : extended; { Size of each subinterval}
    Index : integer;
    F1x, F2x, F3x, F4x,
    F1xPrime, F2xPrime,
    F3xPrime, F4xPrime : extended; { Iteration variables}
    T, X, xPrime : extended; { Values pushed and pulled}
                                { from the stack.}
```

```
procedure InitializeStack(var Values : Ptr);
begin
    Values := nil;
end; { procedure InitializeStack }
```

```
procedure Push(var Values      : Ptr;
               TValue         : extended;
               XValue         : extended;
               XPrimeValue    : extended);
```

```
{-----}
{- Input: Values, TValue, XValue      -}
{-      XPrimeValue                  -}
{- Output: Values                     -}
{-                                  -}
{- Push data onto the Stack           -}
{-----}
```

```
var
    NewNode : Ptr;
```

```
begin
    New(NewNode);
    NewNode.T := TValue;
    NewNode.X := XValue;
    NewNode.XPrime := XPrimeValue;
    NewNode.Next := Values;
    Values := NewNode;
end; { procedure Push }
```

```
procedure Pop(var Values      : Ptr;
              var TValue      : extended;
              var XValue      : extended;
              var XPrimeValue : extended);
```

```
{-----}
{- Input: Values, TValue, XValue      -}
{-      XPrimeValue                  -}
{- Output: Values                     -}
{-                                  -}
{- Pop Data from the Stack            -}
{-----}
```

```
var
    OldNode : Ptr;
```

```

begin
  OldNode := Values;
  Values := OldNode^.Next;
  TValue := OldNode^.T;
  XValue := OldNode^.X;
  XPrimeValue := OldNode^.xPrime;
  Dispose(OldNode);
end; { procedure Pop }

```

```

procedure TestAndInitialize(LowerLimit  : extended;
                           UpperLimit   : extended;
                           var NumIntervals : integer;
                           NumReturn     : integer;
                           var Values     : Ptr;
                           var Spacing    : extended;
                           var Error      : byte);

```

```

{-----}
{- Input: LowerLimit, UpperLimit, NumIntervals, NumReturn -}
{- Output: Values, Spacing, Error -}
{- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -}
{- This procedure initializes the above variables. Values -}
{- is initialized to NIL. Spacing is initialized to -}
{- (UpperLimit - LowerLimit)/NumIntervals. -}
{- NumIntervals and NumReturn are checked for errors (they -}
{- must be greater than zero). -}
{-----}

```

```

begin
  Error := 0;
  if NumReturn <= 0 then
    Error := 1;
  if NumIntervals < NumReturn then
    Error := 2;
  if LowerLimit = UpperLimit then
    Error := 3;
  if Error = 0 then
    begin
      InitializeStack(Values);
      Spacing := (UpperLimit - LowerLimit)/NumIntervals;
    end;
end; { procedure TestAndInitialize }

```

```

procedure GetValues(NumReturn      : integer;
                    NumIntervals    : integer;
                    var Values      : Ptr;
                    var TValues     : TNvector;
                    var XValues     : TNvector;
                    var XDerivValues : TNvector);

```

```

{-----}
{- Input: NumReturn, NumIntervals, Values -}
{- Output: TValues, XValues, XDerivValues -}
{- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -}
{- This procedure fills in the arrays TValues, XValues and -}
{- XDerivValues with data from the Values stack. For example, -}
{- if there are five times as many items on the stack -}
{- (NumIntervals) as should be returned (NumReturn) then -}
{- every fifth value from the stack will be returned. -}
{-----}

```

```

var
  Index, Term : integer;

```

```

T, X, xPrime : extended;

begin
  Term := NumIntervals;
  for Index := NumReturn downto 0 do
    begin
      Pop(Values, T, X, xPrime);
      Term := Pred(Term);
      while (Term / NumIntervals >= Index / NumReturn) and (Term >= 0) do
        begin
          Pop(Values, T, X, xPrime);
          Term := Pred(Term);
        end;
      TValues[Index] := T;
      XValues[Index] := X;
      XDerivValues[Index] := xPrime;
    end;
  end; { procedure GetValues }

begin { procedure InitialCond2ndOrder }
  TestAndInitialize(LowerLimit, UpperLimit,
    NumIntervals, NumReturn, Values, Spacing, Error);
  if Error = 0 then
    begin
      T := LowerLimit;
      X := InitialValue;
      xPrime := InitialDeriv;
      Push(Values, T, X, xPrime);
      HalfSpacing := Spacing / 2;
      for Index := 1 to NumIntervals do
        begin
          F1x := Spacing * xPrime;
          F1xPrime := Spacing * KineticEqn(T, X, xPrime);
          F2x := Spacing * (xPrime + 0.5 * F1xPrime);
          F2xPrime := Spacing * KineticEqn(T + HalfSpacing, X + 0.5 * F1x,
            xPrime + 0.5 * F1xPrime);
          F3x := Spacing * (xPrime + 0.5 * F2xPrime);
          F3xPrime := Spacing * KineticEqn(T + HalfSpacing, X + 0.5 * F2x,
            xPrime + 0.5 * F2xPrime);
          F4x := Spacing * (xPrime + F3xPrime);
          F4xPrime := Spacing * KineticEqn(T + Spacing, X + F3x, xPrime +
            F3xPrime);
          X := X + (F1x + 2 * F2x + 2 * F3x + F4x) / 6;
          xPrime := xPrime + (F1xPrime + 2 * F2xPrime + 2 * F3xPrime + F4xPrime)
            / 6;
          T := T + Spacing;
          Push(Values, T, X, xPrime);
        end;
      GetValues(NumReturn, NumIntervals, Values, TValues, XValues, XDerivValues);
    end;
  end; { procedure InitialCond2ndOrder }

```


RESUME

Cette étude porte sur la réalisation de biocapteurs et la mise au point d'un système d'analyse par injection en flux continu (FIA). Ces systèmes sont destinés au dosage de composés polluants présents dans l'eau, notamment de pesticides organophosphorés et de carbamates.

Ces biocapteurs associent une électrode de pH et une membrane enzymatique. Différentes techniques d'immobilisation des cholinestérases (acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase) sur des membranes polyamide pré-activées, par piégeage dans un gel polymère et sur des membranes en toile de NylonTM sont d'abord présentées. Ensuite, l'optimisation des conditions opératoires et la comparaison de leurs performances sont examinées.

Des capteurs enzymatiques à réponse rapide, pour le dosage de substrat, sont réalisés grâce à une nouvelle technique d'immobilisation d'enzyme sur électrode de verre (Brevet français F-9011630, 1990). L'innovation de cette technique réside dans le dépôt par vaporisation d'un agent réticulant sur l'extrémité sensible de l'électrode de verre. Une simulation mathématique de la réponse de ces biocapteurs permet d'apprécier les quantités d'enzyme immobilisées.

Un système FIA basé sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase immobilisée au sein d'un réacteur tubulaire à une rangée de billes, est mis au point pour le dosage des organophosphates et des carbamates. Plusieurs paramètres opératoires sont d'abord optimisés. Ce système est ensuite appliqué au dosage d'insecticides contaminant accidentellement l'eau de mer. La réactivation, dans le réacteur, de l'enzyme inhibée permet sa réutilisation de nombreuses fois.

MOTS-CLES:

Biocapteurs - Immobilisation - Electrodes enzymatiques - Composés polluants - Pesticides - Organophosphates - Carbamates - FIA (Flow Injection Analysis).